

# Chromatografické metody II.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Aplikační rozsah chromatografie

Metoda	Přibližný rozsah $M_r$ analytů	Analyzované látky
GC	1- 400	plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
HPLC	$3 \cdot 10^6$	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
PC, TLC	100 - 2000	ionty, látky polární i nepolární
CE (CZE, CEC, MEKC)	$3 \cdot 10^6$	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery



# PC a TLC



# PC a TLC

- ◆ 1944 – Martin, Syngge - PC aminokyselin (Nobelova cena)
- ◆ 1952 – TLC nahrazuje PC
  - ◆ Homogenita
  - ◆ Agresivní činidla pro detekci
  - ◆ Preparativní použití

The background features a circular grid pattern, similar to a chromatogram or a technical drawing, with a hand holding a pen pointing to a specific spot on the grid. The entire image has a dark brown, monochromatic color scheme.

# Instrumentace PC a TLC

# Chromatografický papír

- ◆ Nemodifikovaný
- ◆ Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Watman (Anglie)

Schleicher-Schüll (Německo)



# TLC

- ◆ Vlastní příprava - sypané, nalévané
- ◆ Komerčně dostupné - Silufol (Cz)  
Watman

# PC a TLC - mody

- ◆ rozdělovací
- ◆ adsorpční
- ◆ ionexová
- ◆ hydrofobní – RP a HIC
- ◆ gelová permeační

# Nanášení vzorku

- ◆ Pipety

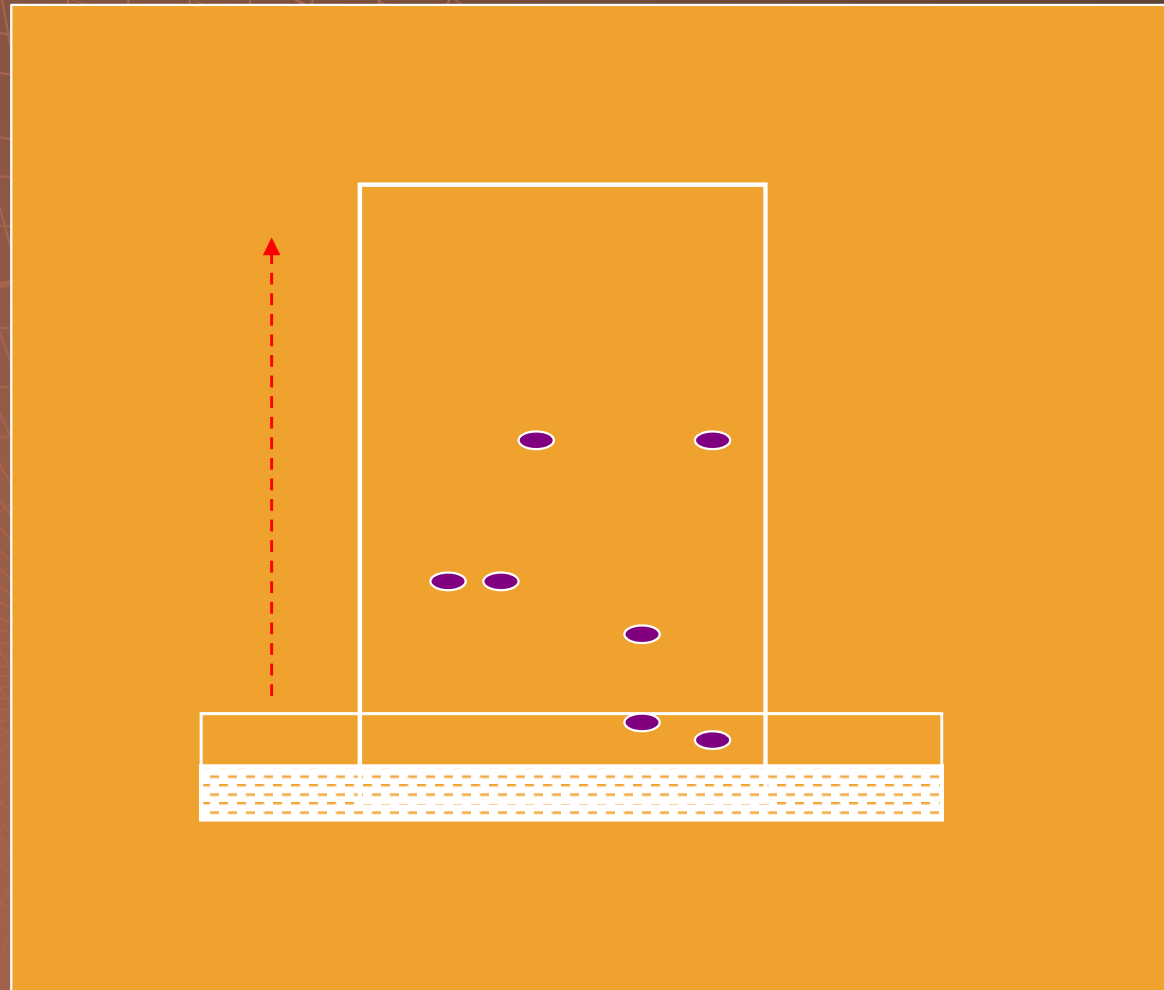
- ◆ Kapiláry

# Provedení

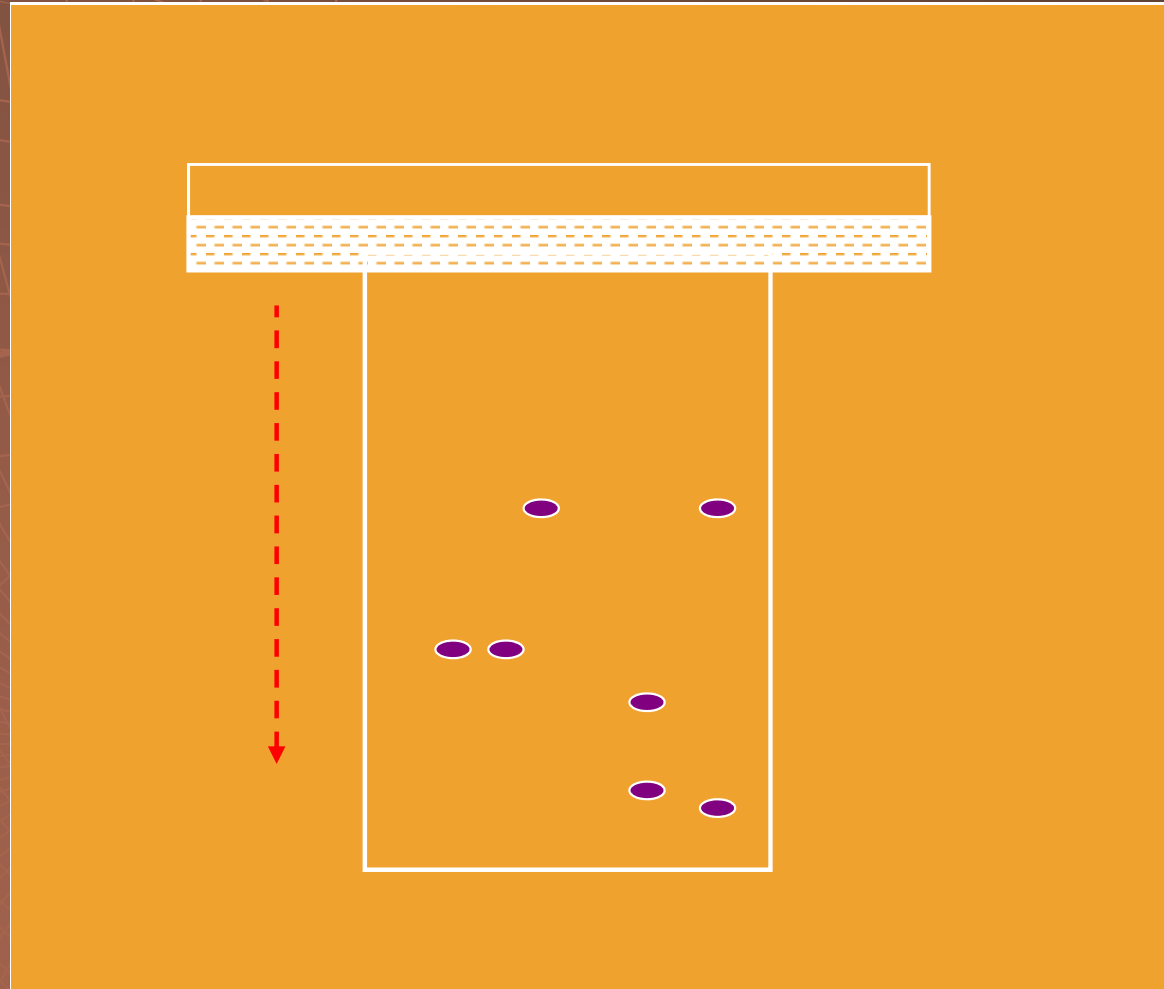
- ◆ Vzestupné
- ◆ Sestupné
- ◆ Kruhové
- ◆ Dvojrozměrné



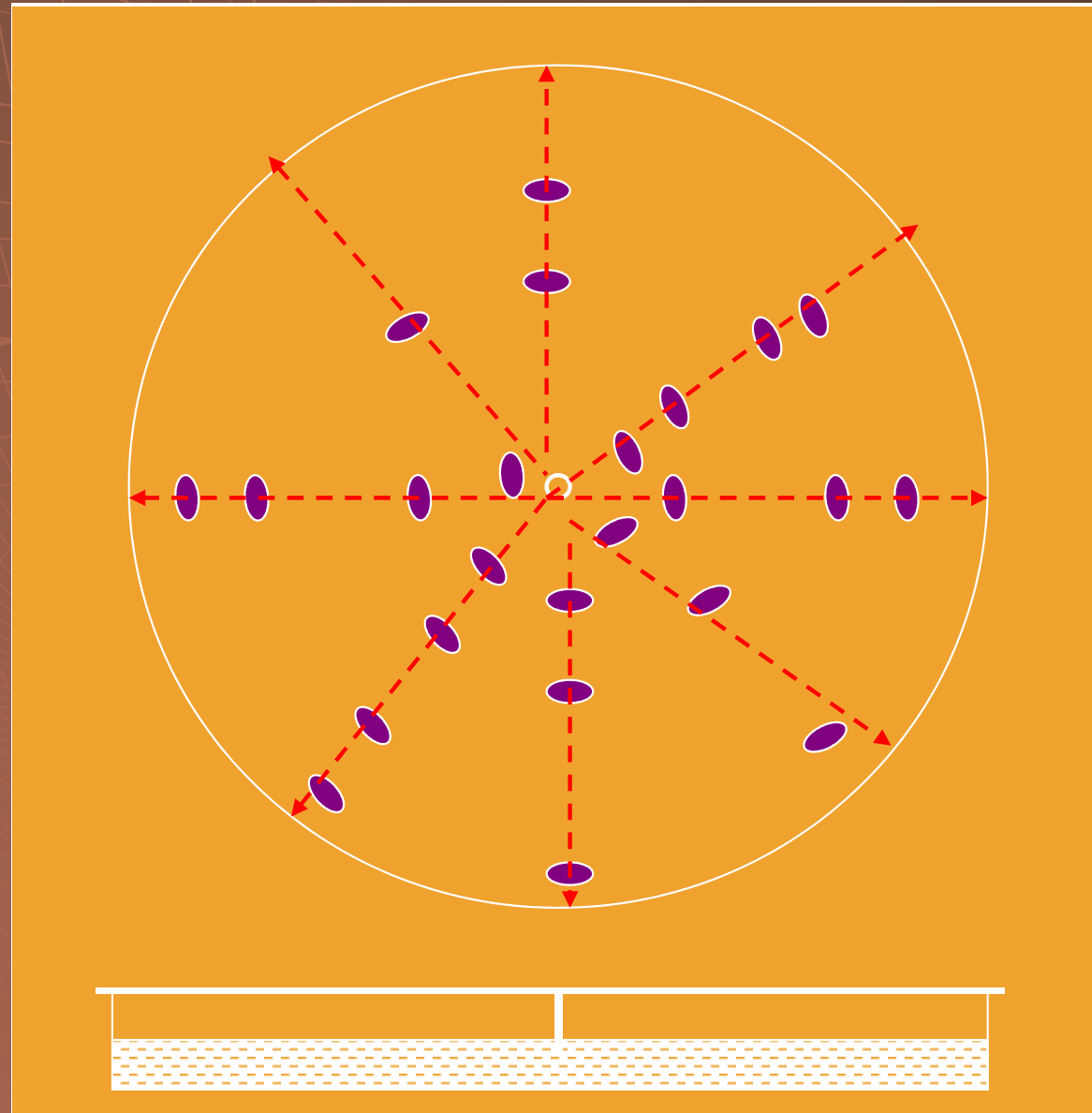
# Vzestupné



# Sestupné



# Kruhové



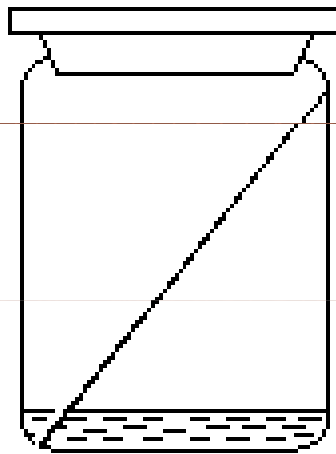
# Kruhové



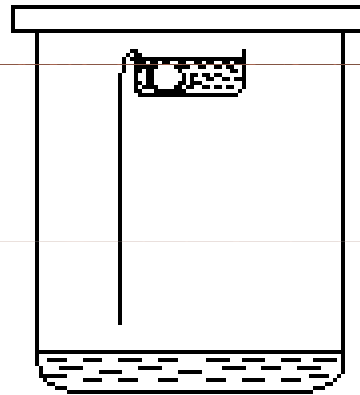


# Vyvíjení

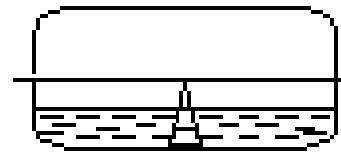
vzestupné  
vyvíjení



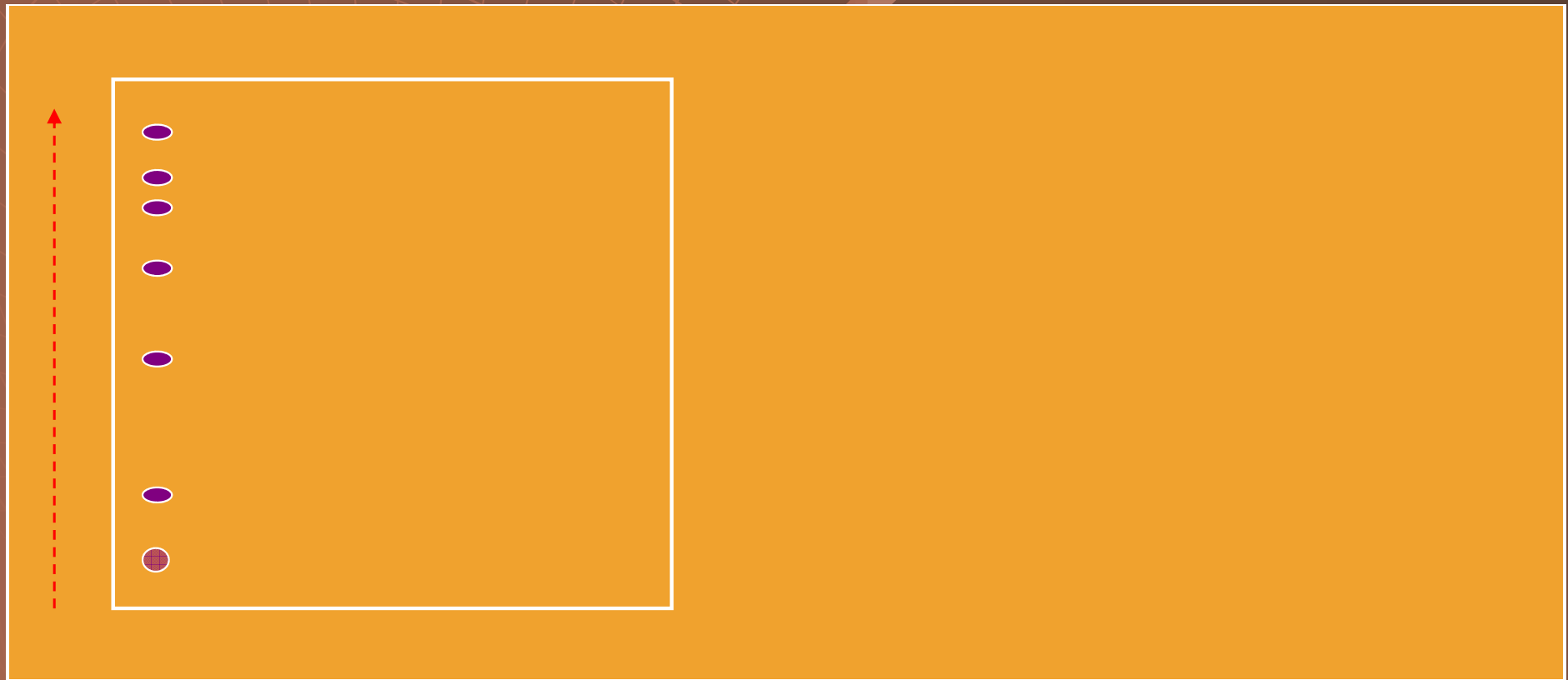
sestupné  
vyvíjení



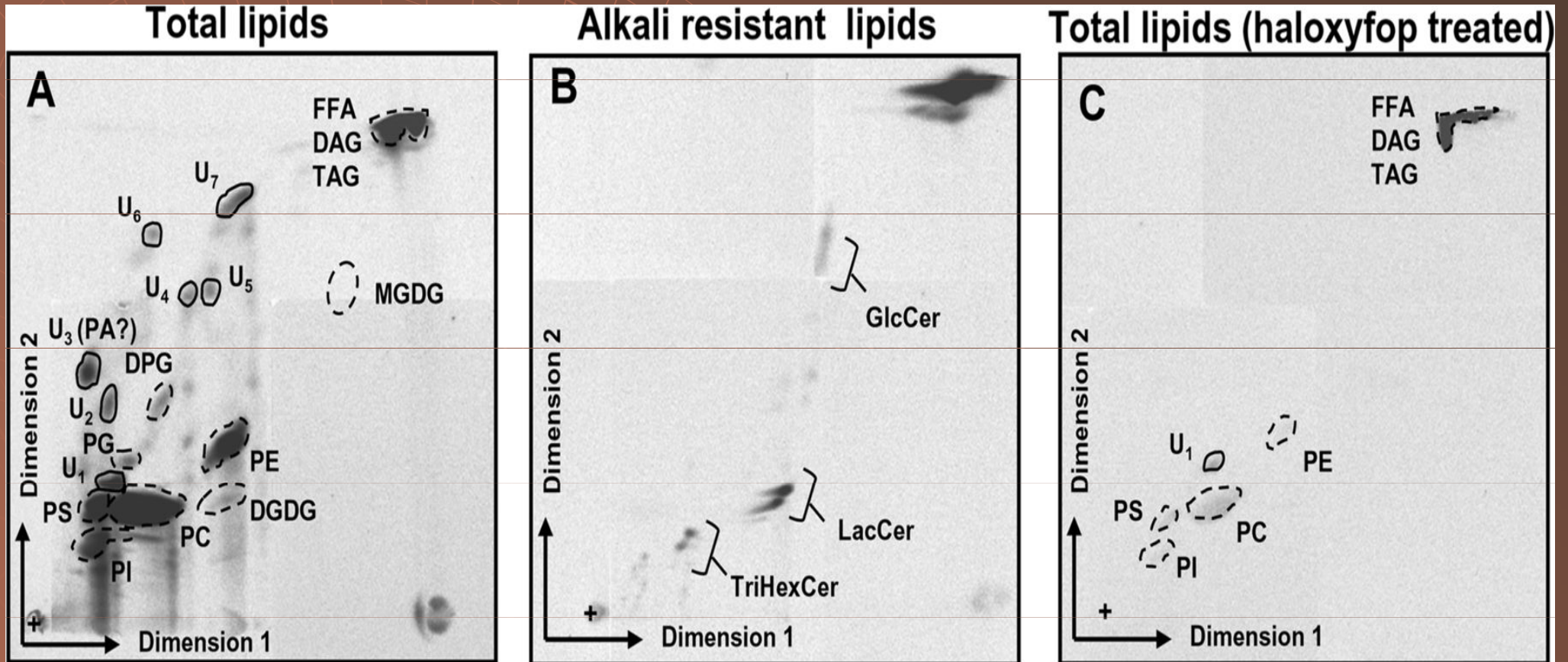
kruhové  
(radiální)  
vyvíjení



# Dvojrozměrné



# Dvojrozměrné



# Provedení

- ◆ Analytické
- ◆ Preparativní



# Detekce

- ◆ Fyzikální
  - UV VIS
  - Fluorescence
- ◆ Chemická – derivatizace
  - Specifická
  - Nespecifická
- ◆ Na základě biologické aktivity
- ◆ MS

# Detekce MS

**LESA™**  
(Liquid Extraction Surface Analysis)



TriVersa®  
NanoMate, Advion

**TLC-MALDI-MS**



TLC MALDI Adapter,  
Bruker Daltonics

**TLC-DESI-MS**



Anal. Bioanal. Chem.  
391 (2008) 1627

**Elution-based TLC-MS**



TLC-MS Interface  
Camag

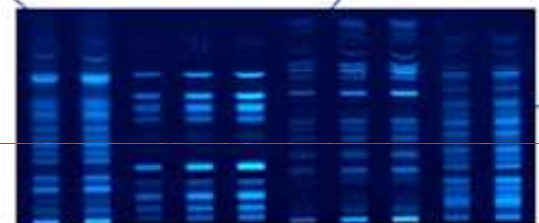


Plate Express  
Advion

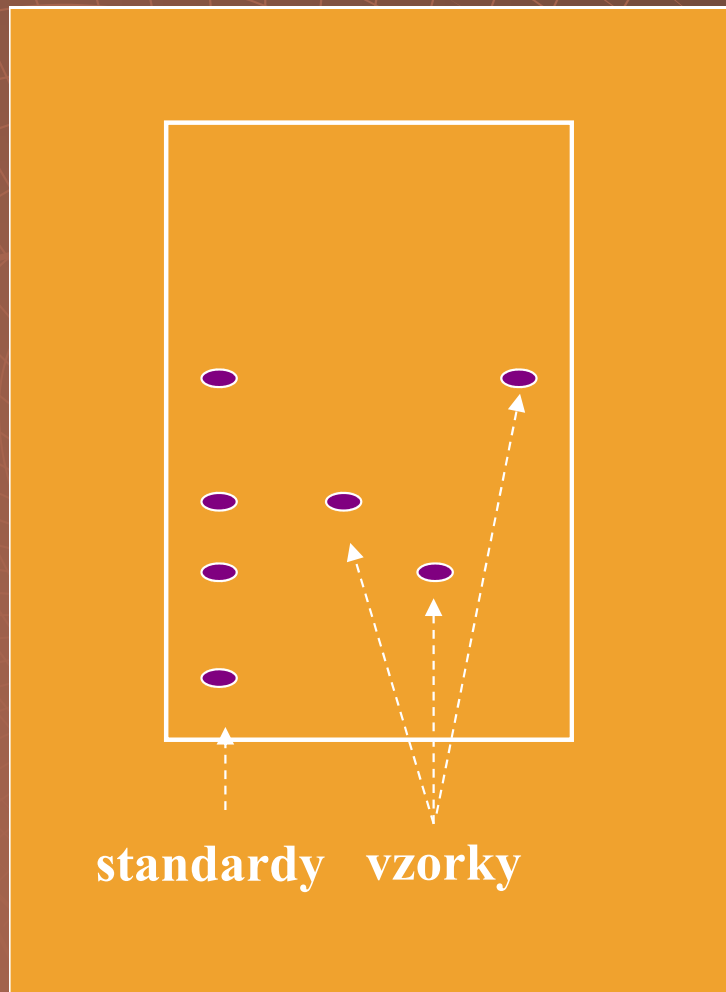
**TLC-DART-MS**



Rapid Commun. Mass Spectrom.  
2011, 25, 2275 - 2282

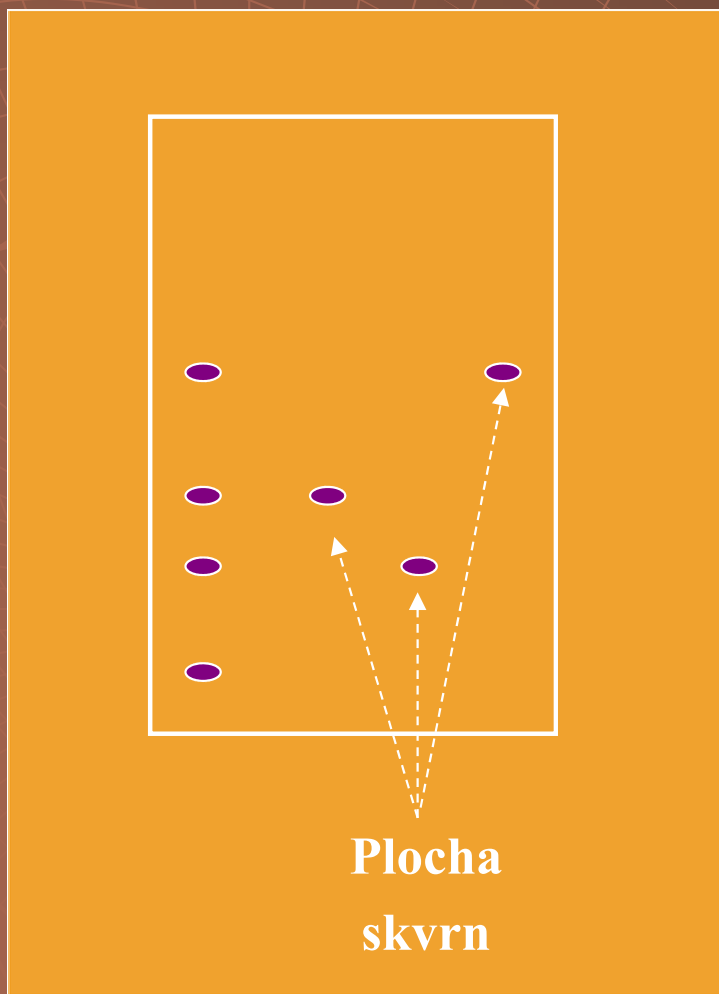


# Analýza kvalitativní



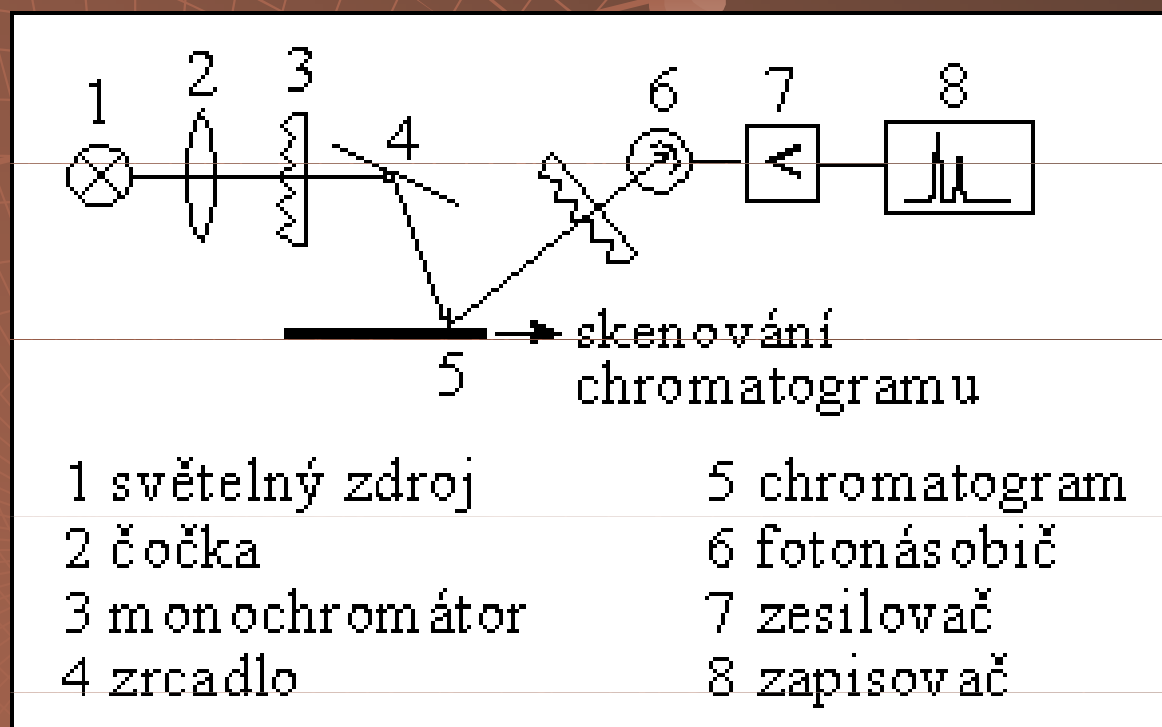
$$R_f = \frac{\textit{střed skvrny}}{\textit{čelo rozpouštědla}}$$

# Analýza kvantitativní

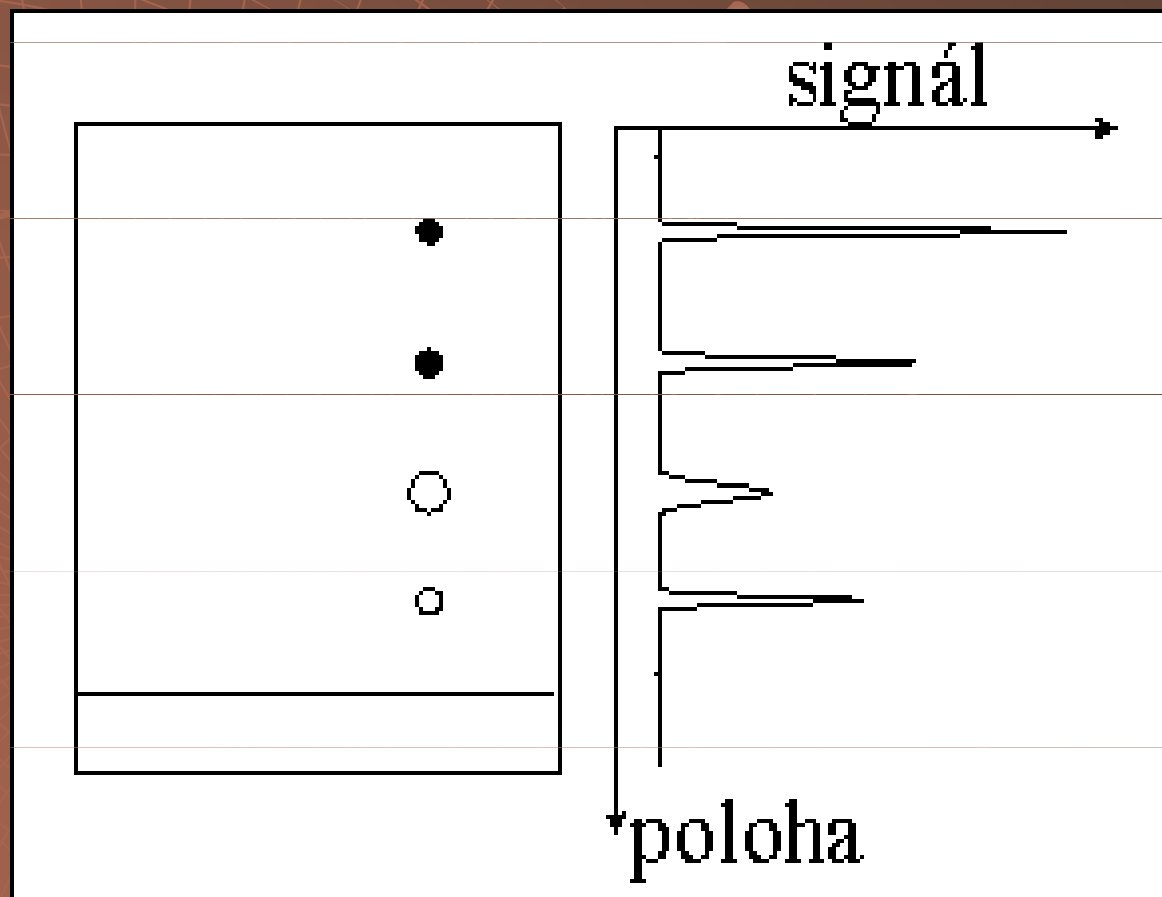


- ◆ Planimetrie
- ◆ Densitometrie

# Denzitometrie



# Denzitometrie





# Preparace

- ◆ PC – vystřížení a eluce skvrny
- ◆ TLC – vyškrábání a eluce skvrny
  - odsání a eluce skvrny

# Kolonová chromatografie



# Kapalinová chromatografie rozdělení

- ◆ Nízkotlaká (atmosferický tlak) – LPC
- ◆ Střednětlaká (4 Mpa) – FPLC
- ◆ Vysokotlaká (40 Mpa) – HPLC
- ◆ Ultravysokotlaká (100 Mpa) – UPLC

# Kapalinová chromatografie využití

- ◆ LPC – preparativní
- ◆ FPLC – semipreparativní a analytická
- ◆ HPLC – analytická
- ◆ UPLC – analytická

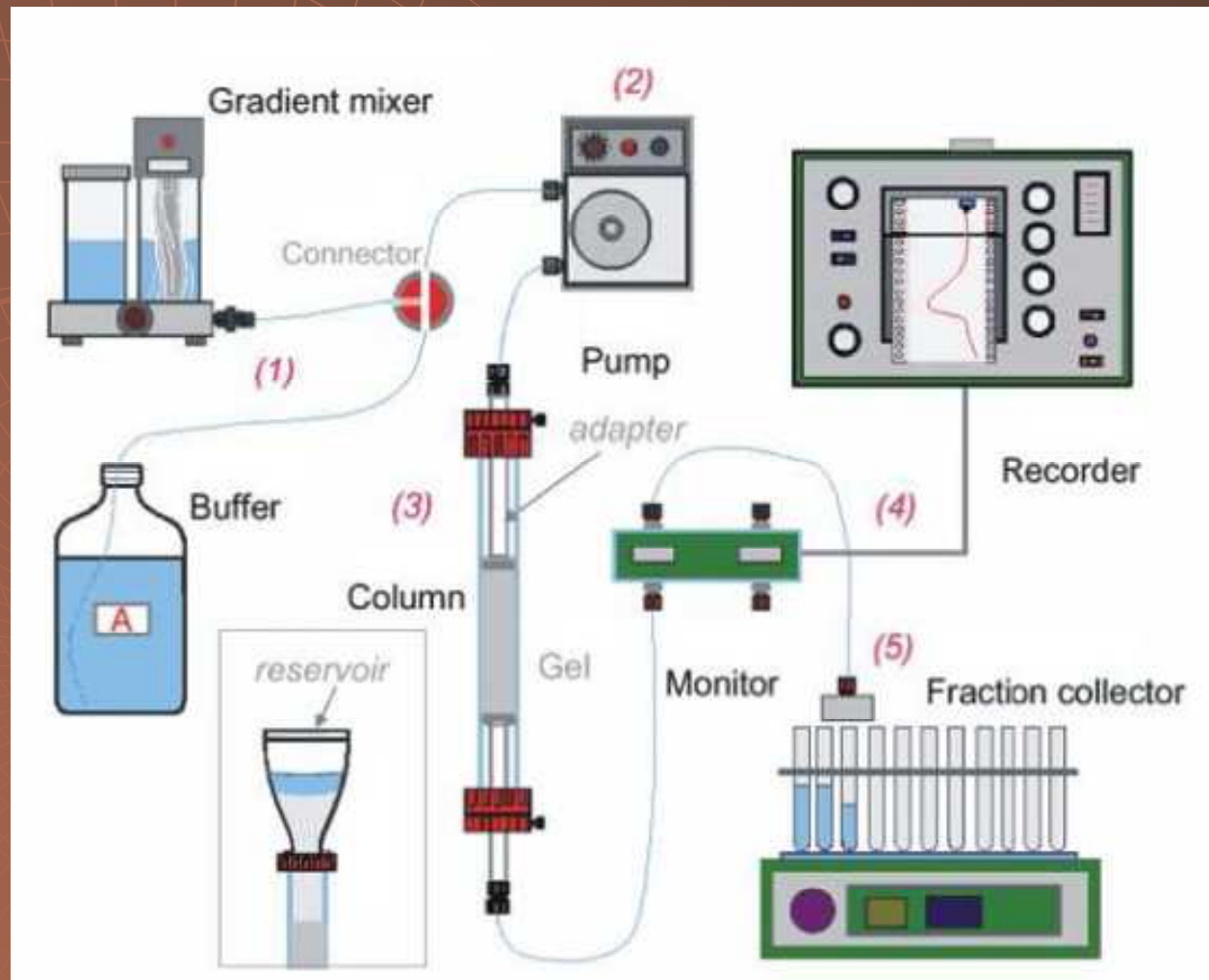
# Kapalinová chromatografie

## doba trvání

- ◆ LPC – hodiny
- ◆ FPLC – desítky minut
- ◆ HPLC – minuty
- ◆ UPLC - sekundy



# Zařízení pro LPC





# Zařízení pro LPC



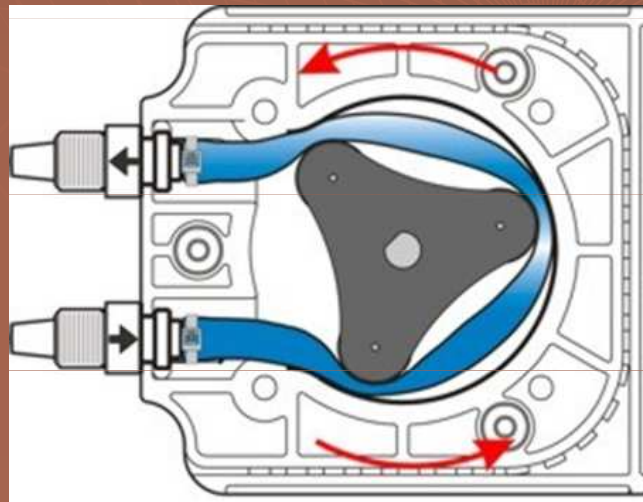
# Zařízení pro LPC



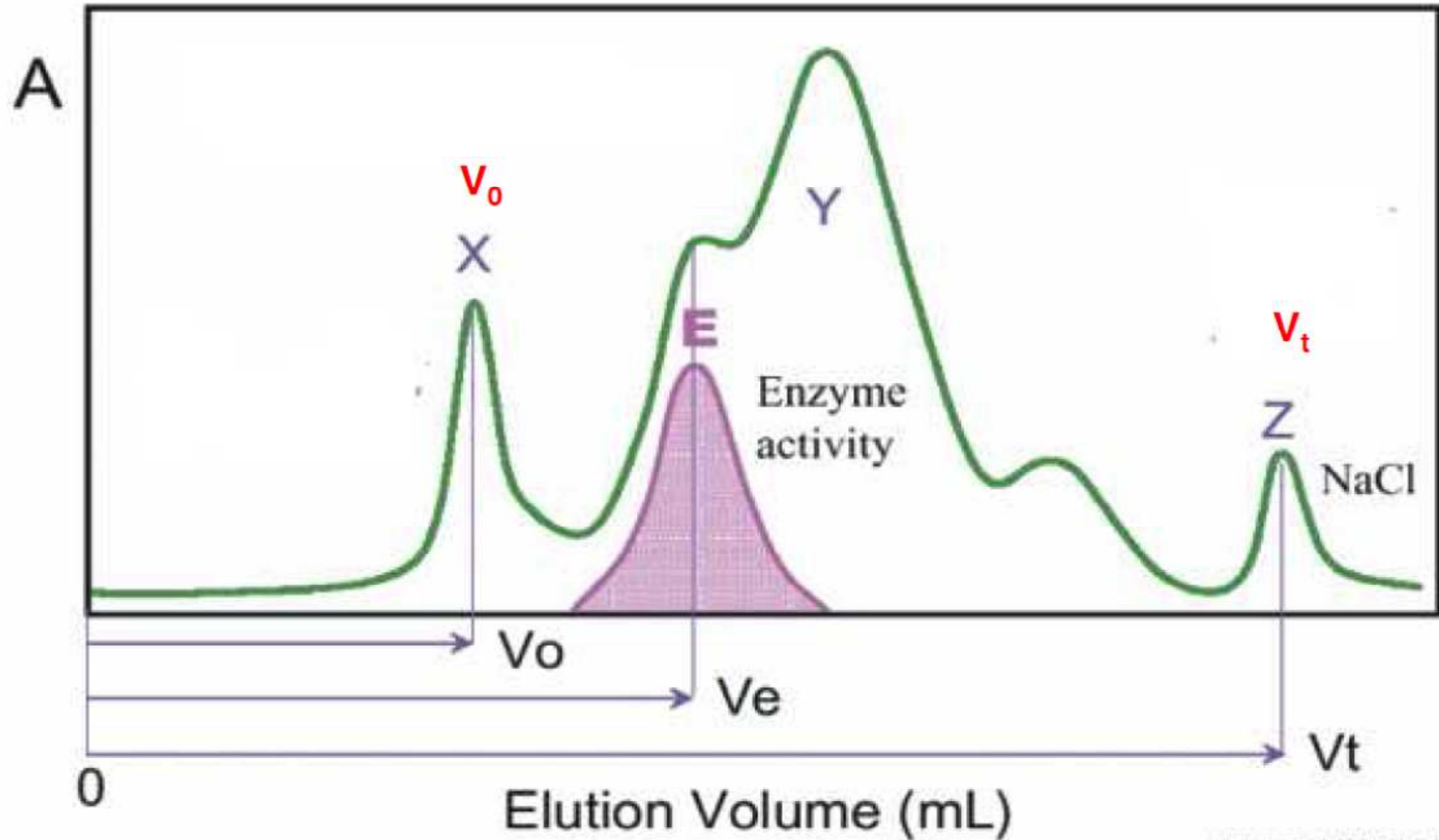
# Instrumentace pro LPC

- ◆ Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- ◆ Gradient – mísič gradientu
- ◆ Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- ◆ Kolony – skleněné
- ◆ Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm
- ◆ Vyhodnocování – zapisovač
- ◆ Sběrač frakcí – programovatelný

# Zařízení pro LPC



# LPC



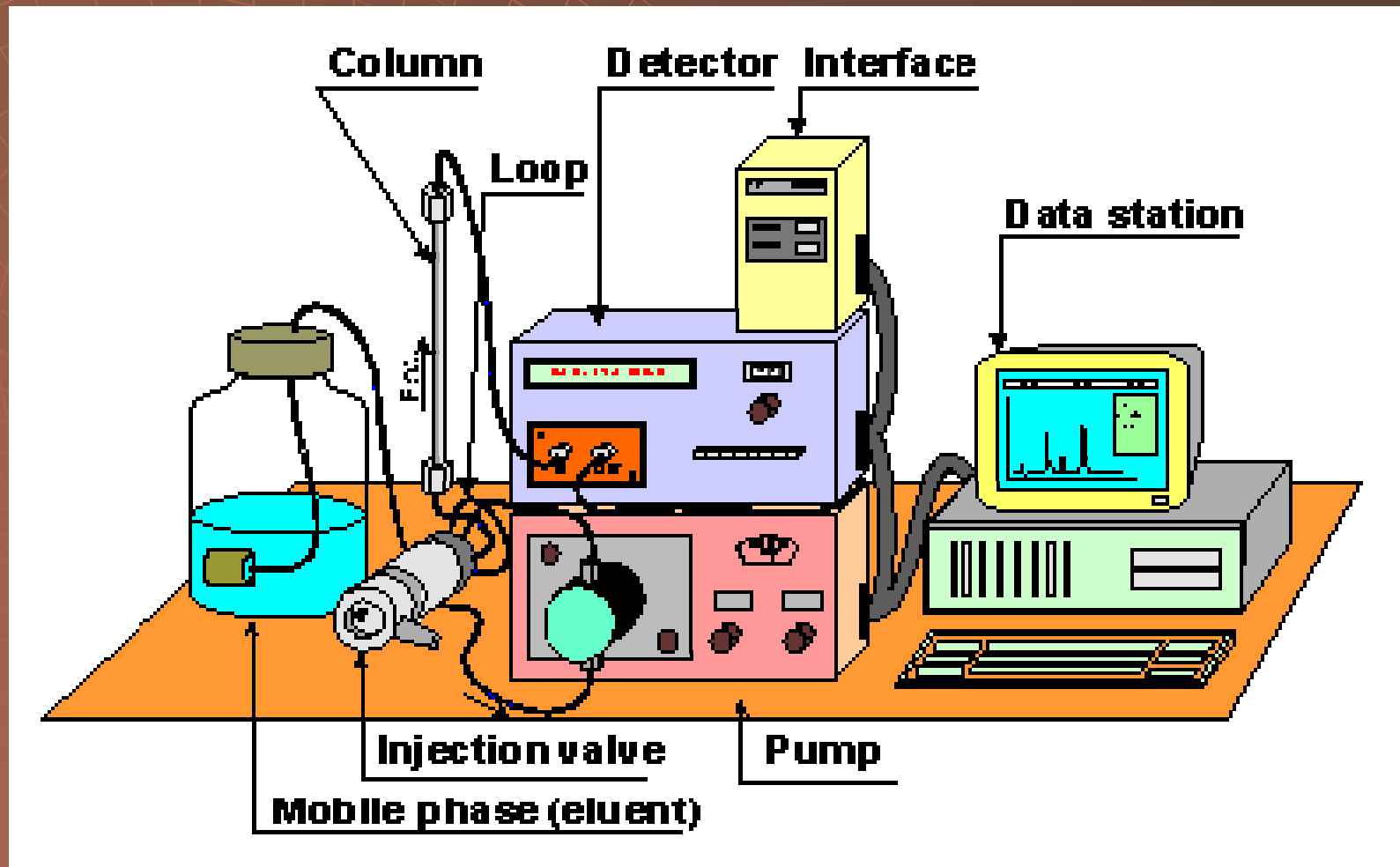




# Instrumentace pro FPLC a HPLC



# Zařízení pro FPLC a HPLC



# Zařízení pro FPLC



# Zařízení pro HPLC



# Zařízení pro U(H)PLC

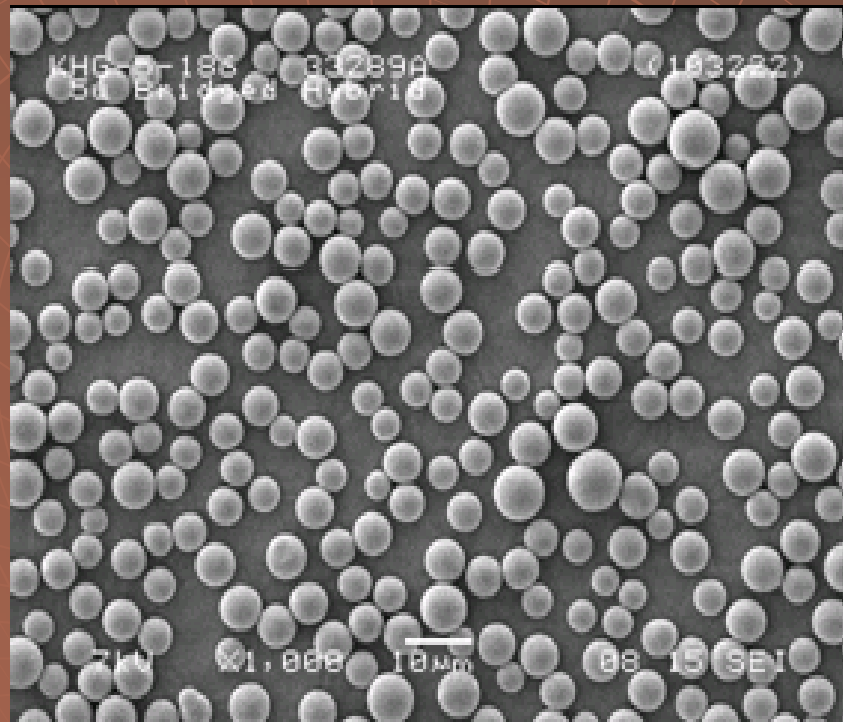


# UPLC x HPLC

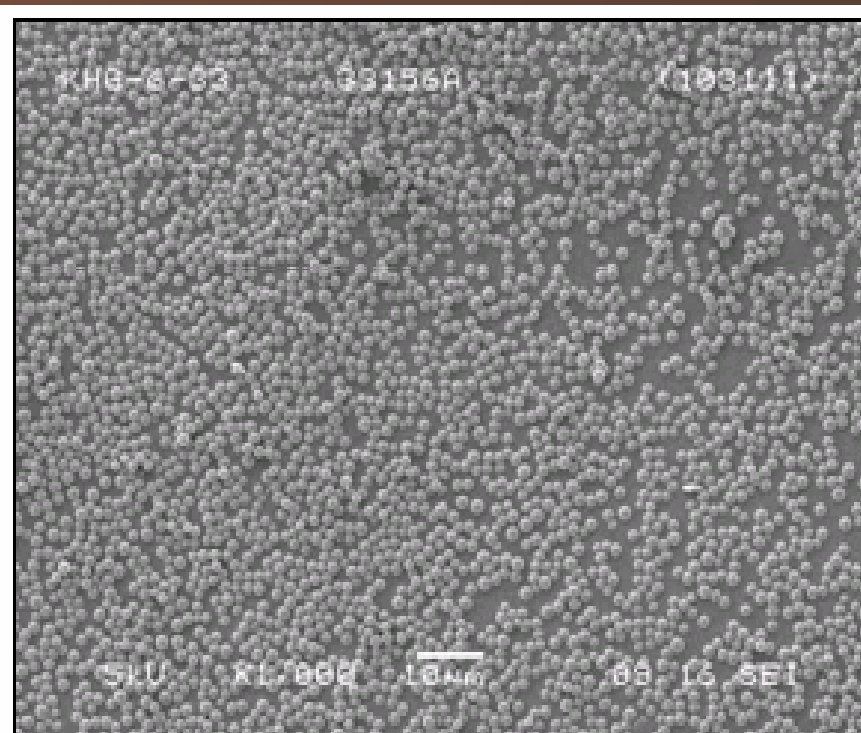
- kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita)
- snížení nákladů = menší spotřeba HPLC rozpouštědel (ekologie)
- zvýšení separační účinnosti
- snížení meze detekce – zvýšení citlivosti
- •více kvalitativních informací



# UPLC x HPLC



**5 µm Particles**



**1.7 µm UPLC Particles**

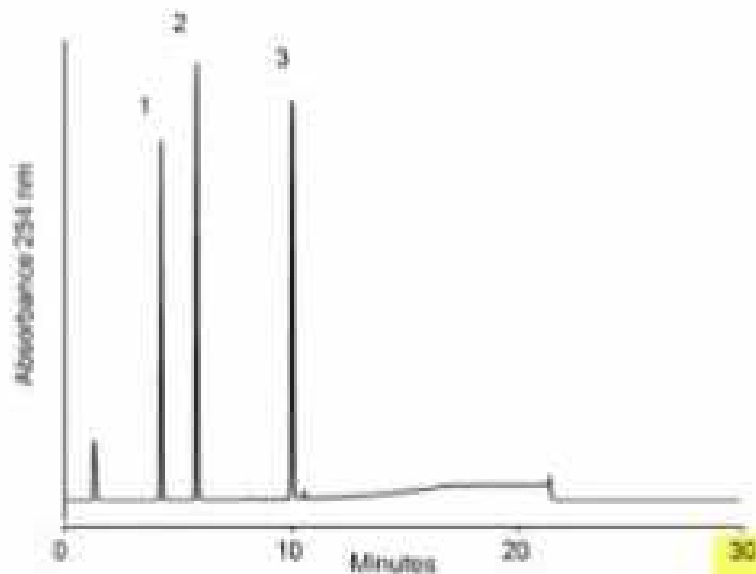


# UPLC x HPLC

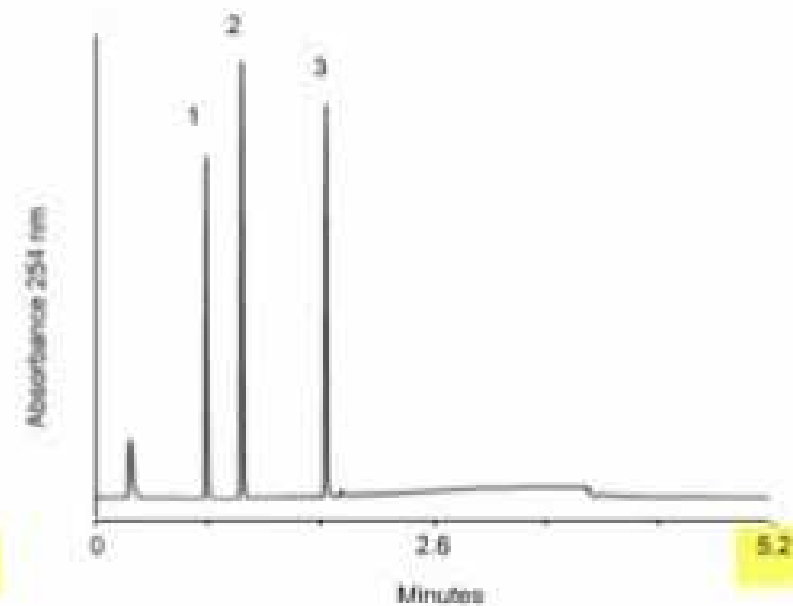
Waters

©2007 Waters Corporation

HPLC Converted to UPLC™

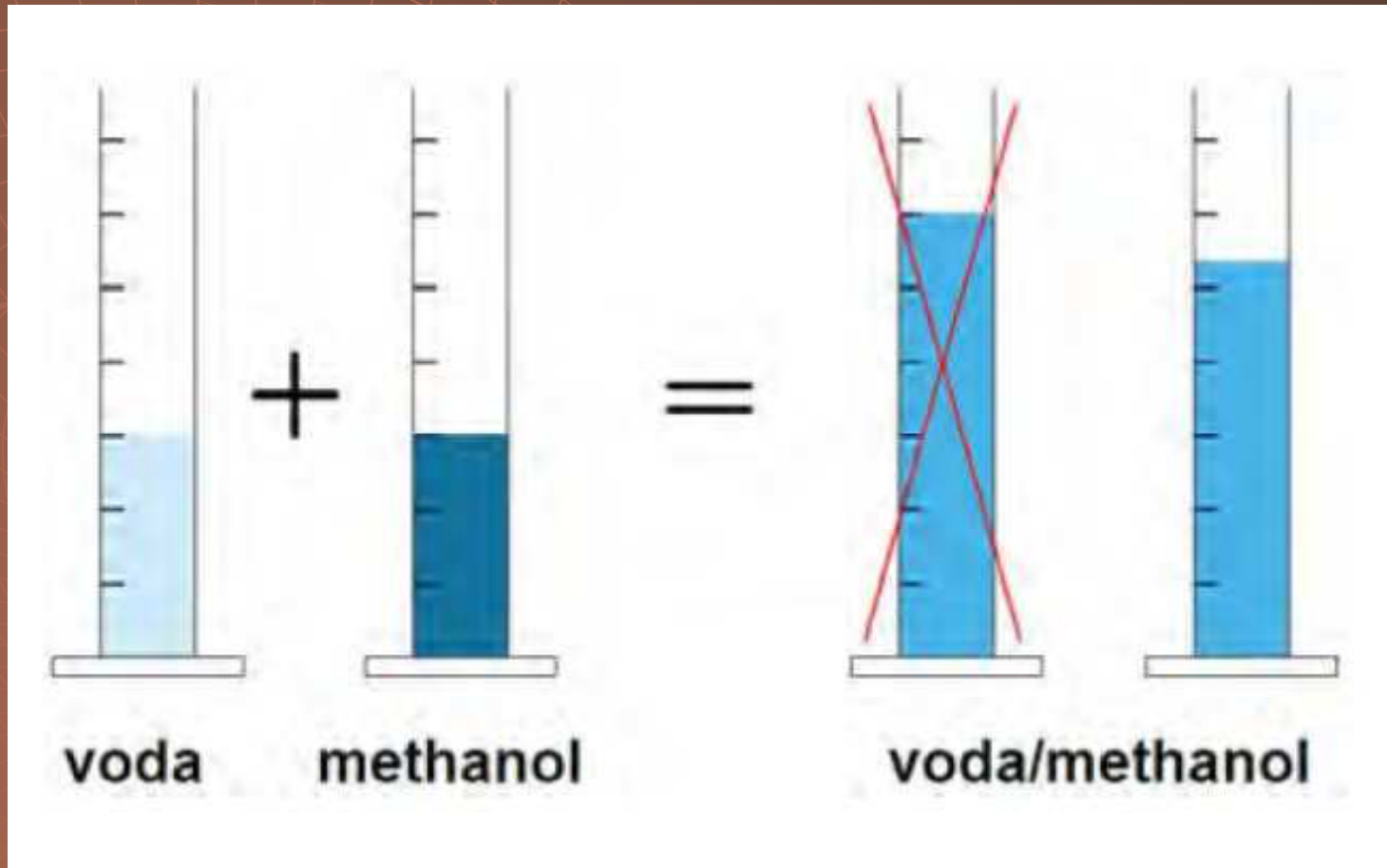


Original 30 minute HPLC



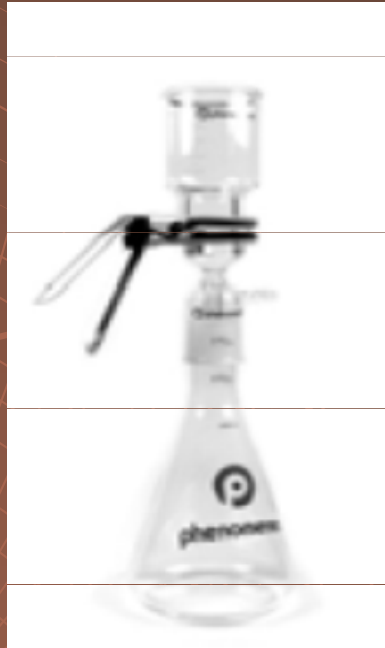
Converted 5.2 minute UPLC™

# Příprava mobilní fáze



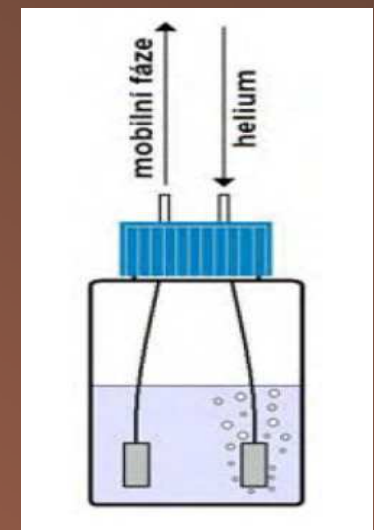
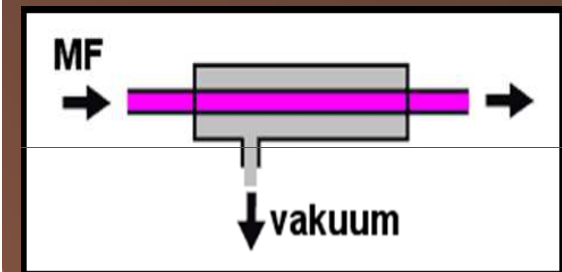
# Příprava mobilní fáze

- filtrace



# Odplynění mobilní fáze

- přechod varem za nízkého tlaku
- ozvučení ultrazvukem
- vakuová filtrace
- in-line membránové odplynění
- probublávání inertním plynem



A stylized illustration of a pumpkin on a spiderweb. The spiderweb is a complex, multi-layered structure of thin, light brown lines, centered on the left side of the frame. A single, larger, light brown spiderweb line extends from the center towards the right, ending in a small, light brown, rounded shape that resembles a pumpkin. The background is a solid, dark brown color. The word "Pumpy" is written in a white, sans-serif font, centered over the spiderweb and the pumpkin shape.

Pumpy

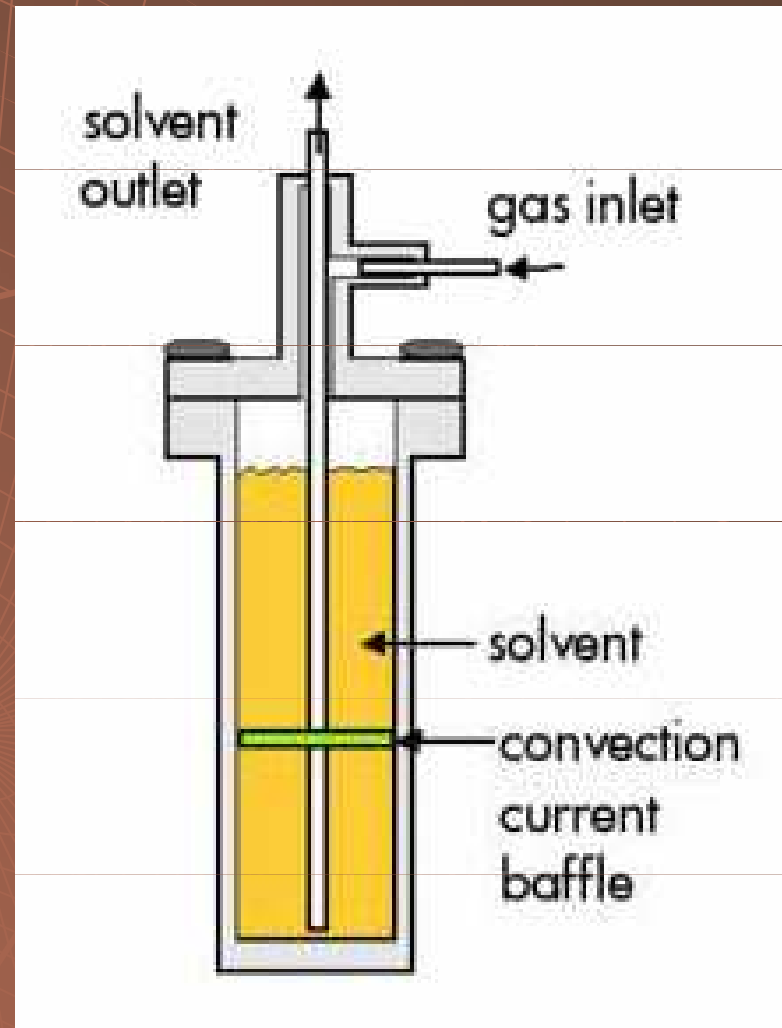


The background features a faint, light-colored grid pattern overlaid on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling the structure of a pump impeller. A small, light-colored object, possibly a pump component, is visible near the center of the grid.

# Pumpy pracující za konstantního tlaku



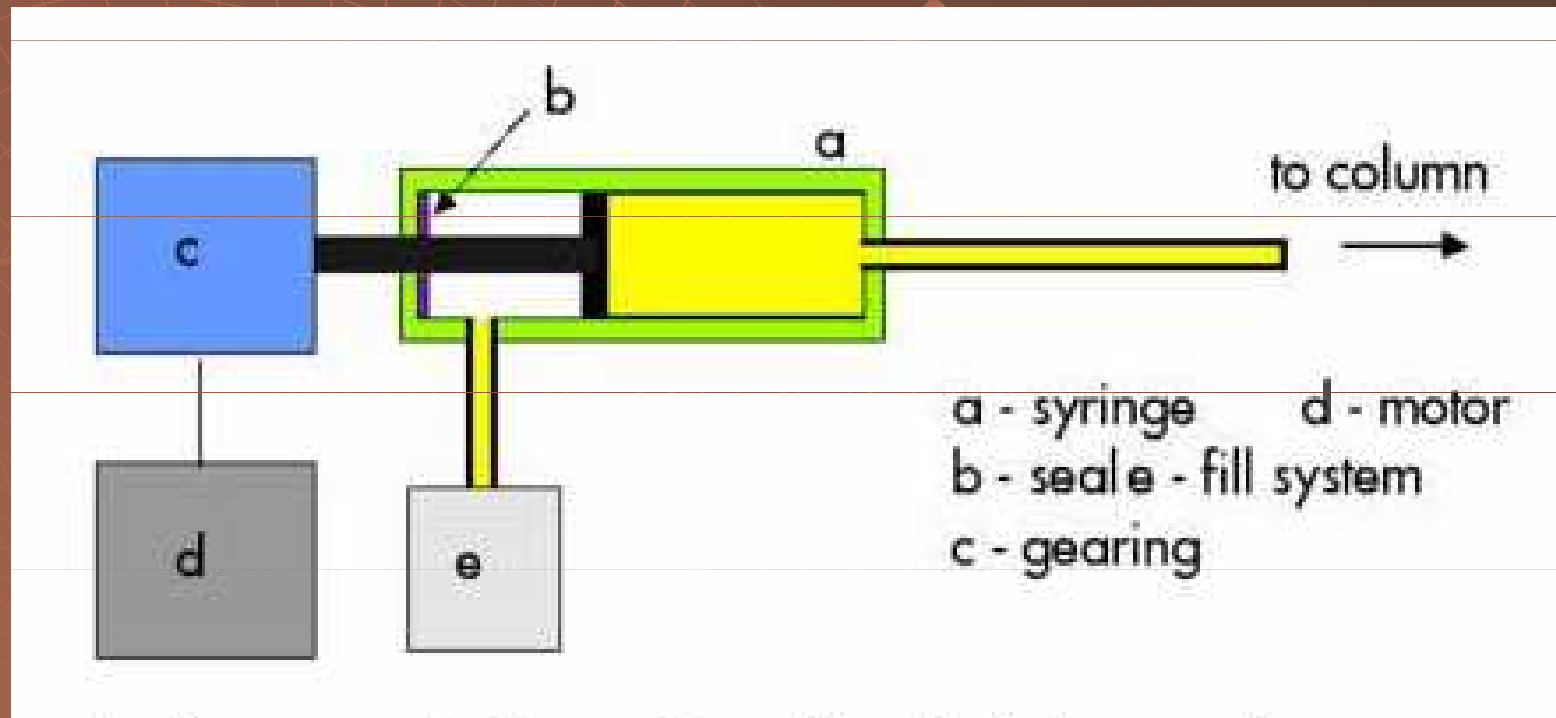
# Tlaková pumpa



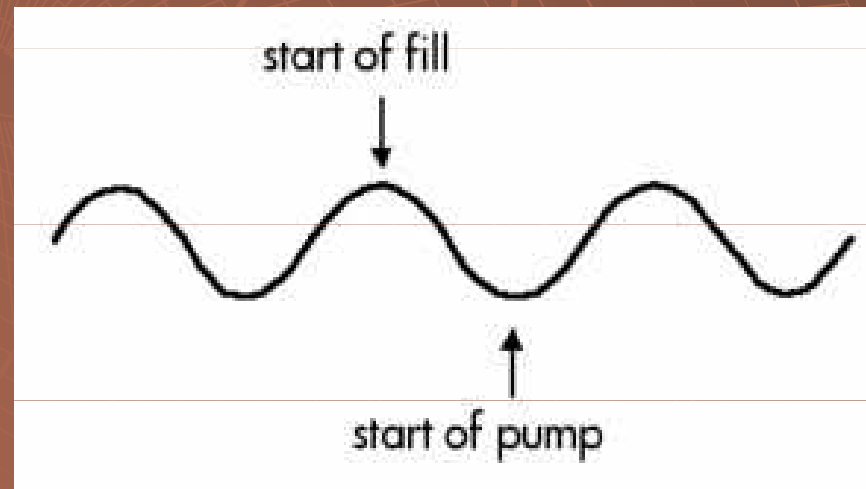
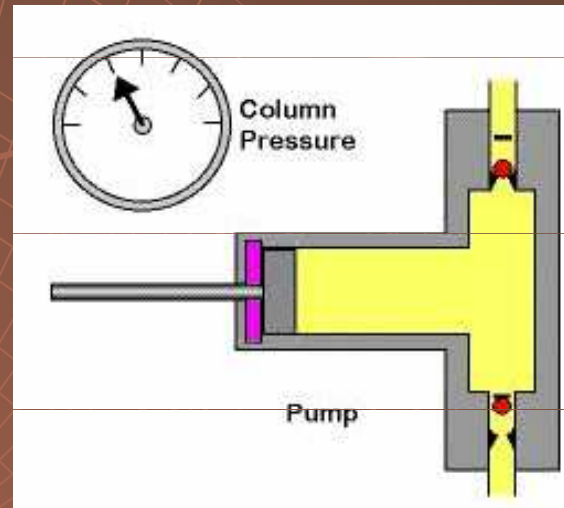
The background features a faint, light-colored grid pattern overlaid on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling the structure of a pump impeller. A small, stylized pump component is visible at the center of the grid.

# Pumpy pracující za konstantního průtoku

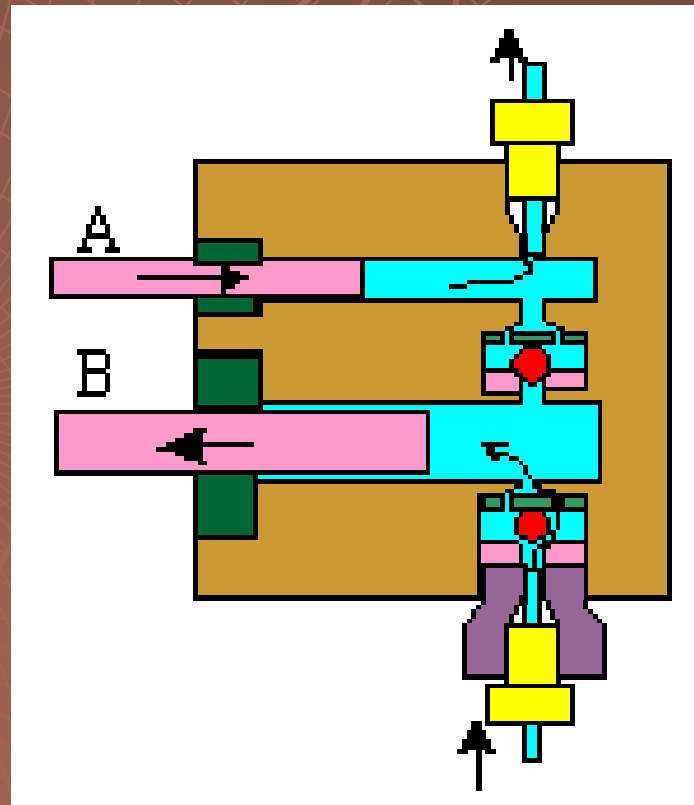
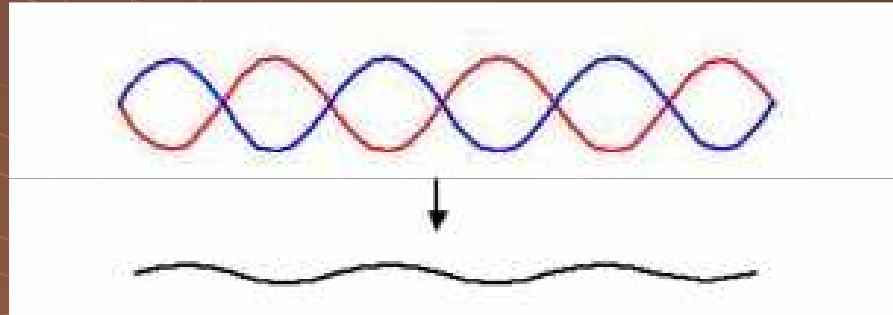
# Lineární dávkovače



# Pumpa jednopístová



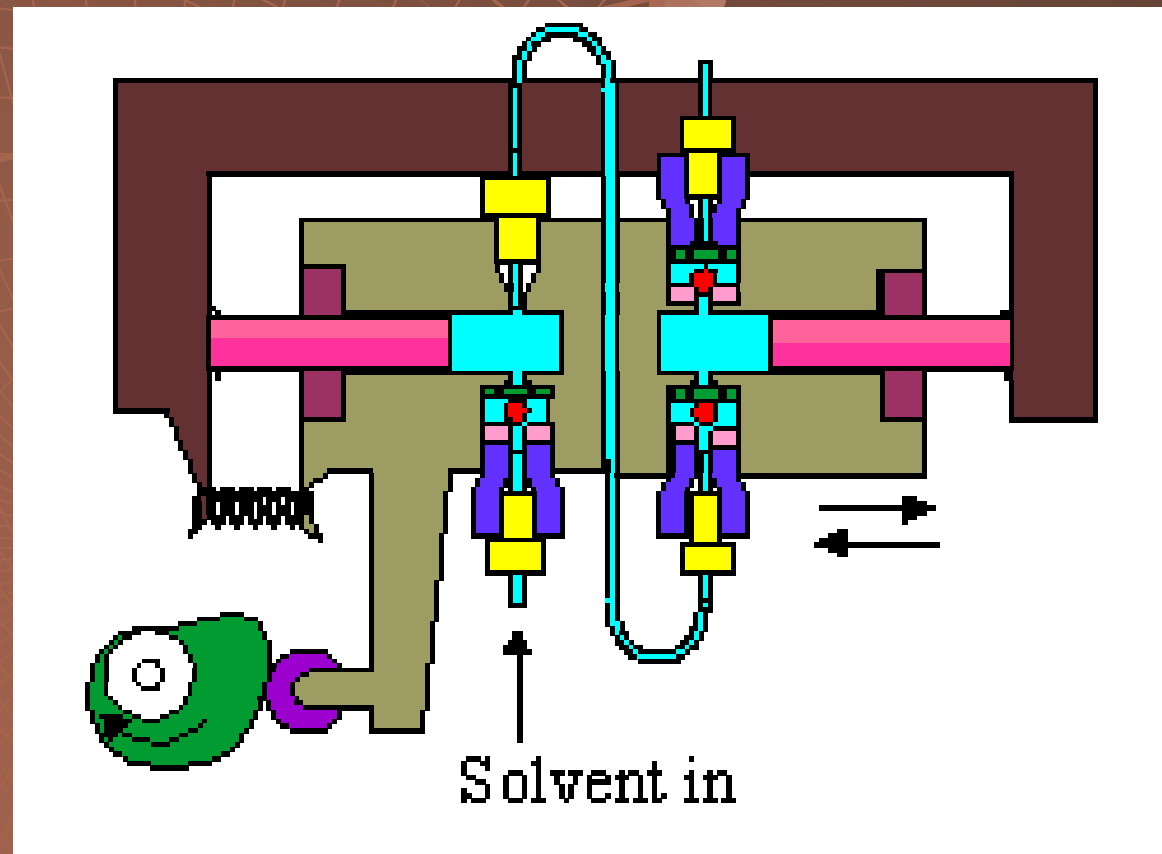
# Pumpa dvoupístová



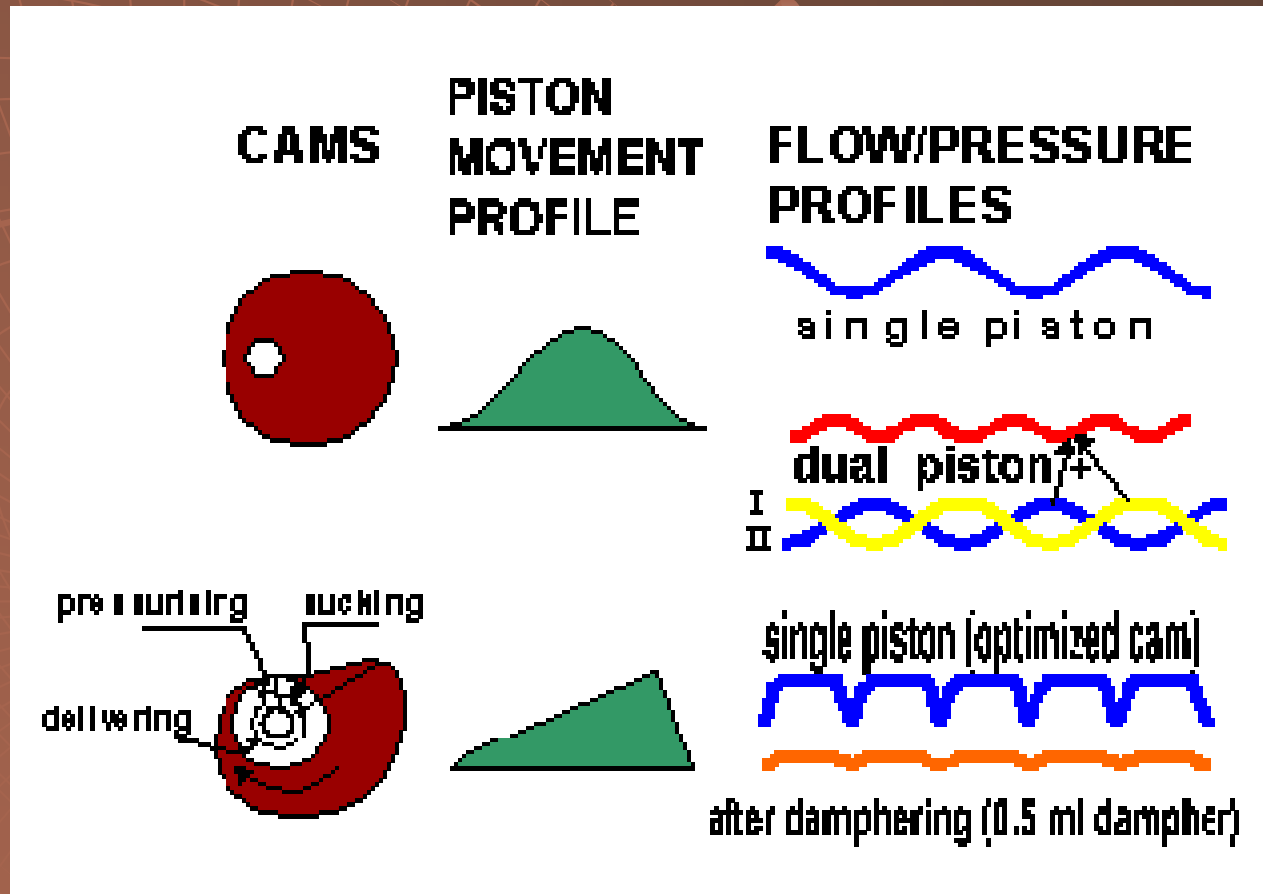




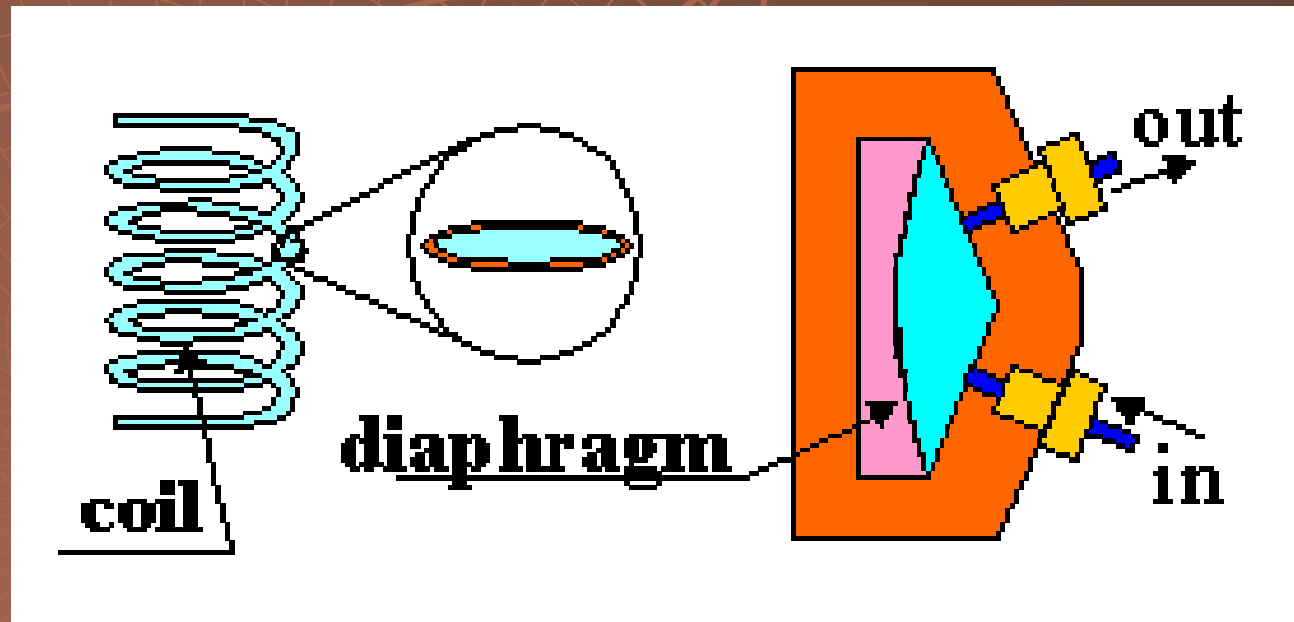
# Pumpa dvoupístová



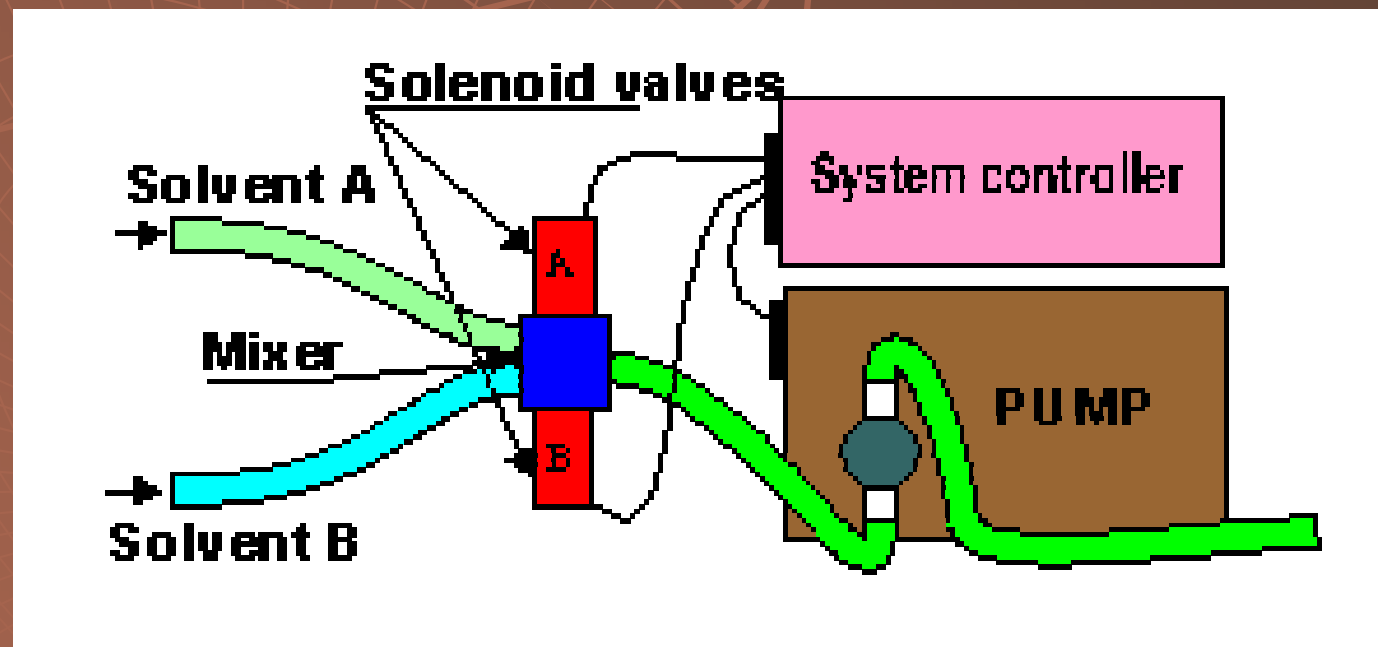
# Tlumení pulsů



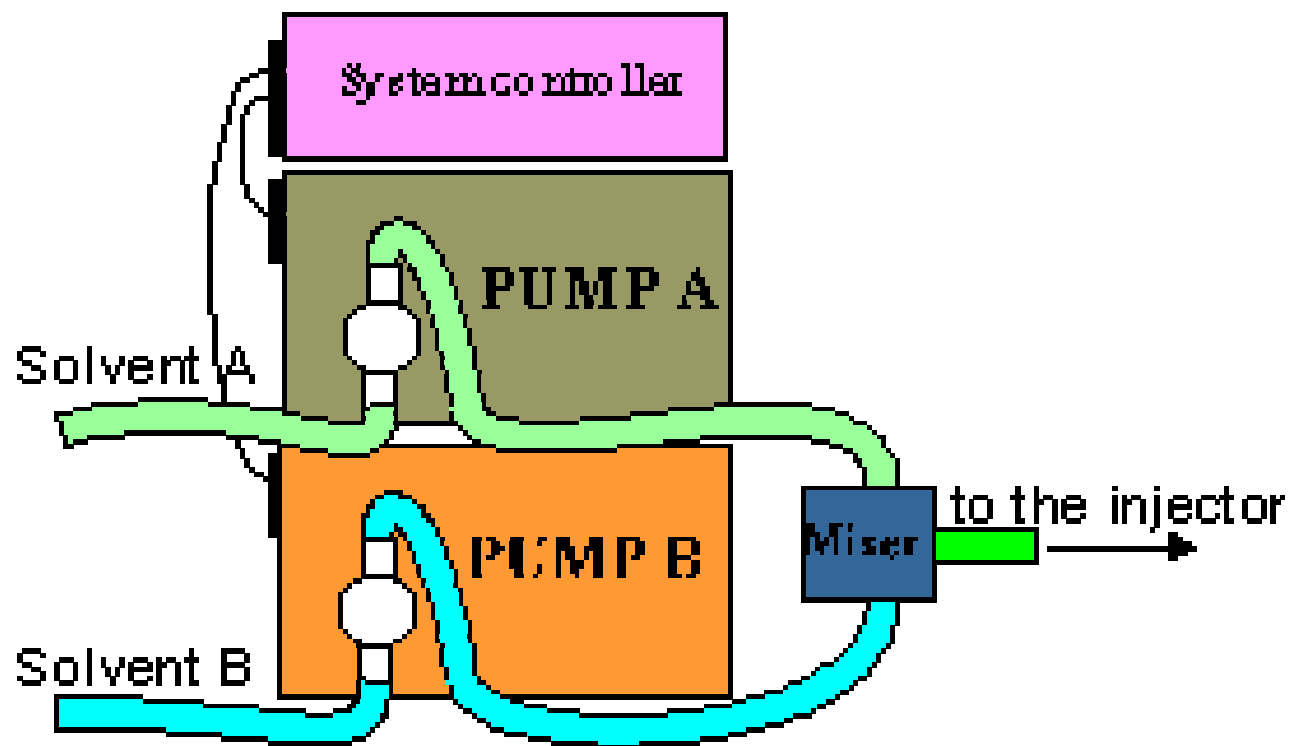
# Tlumení pulsů



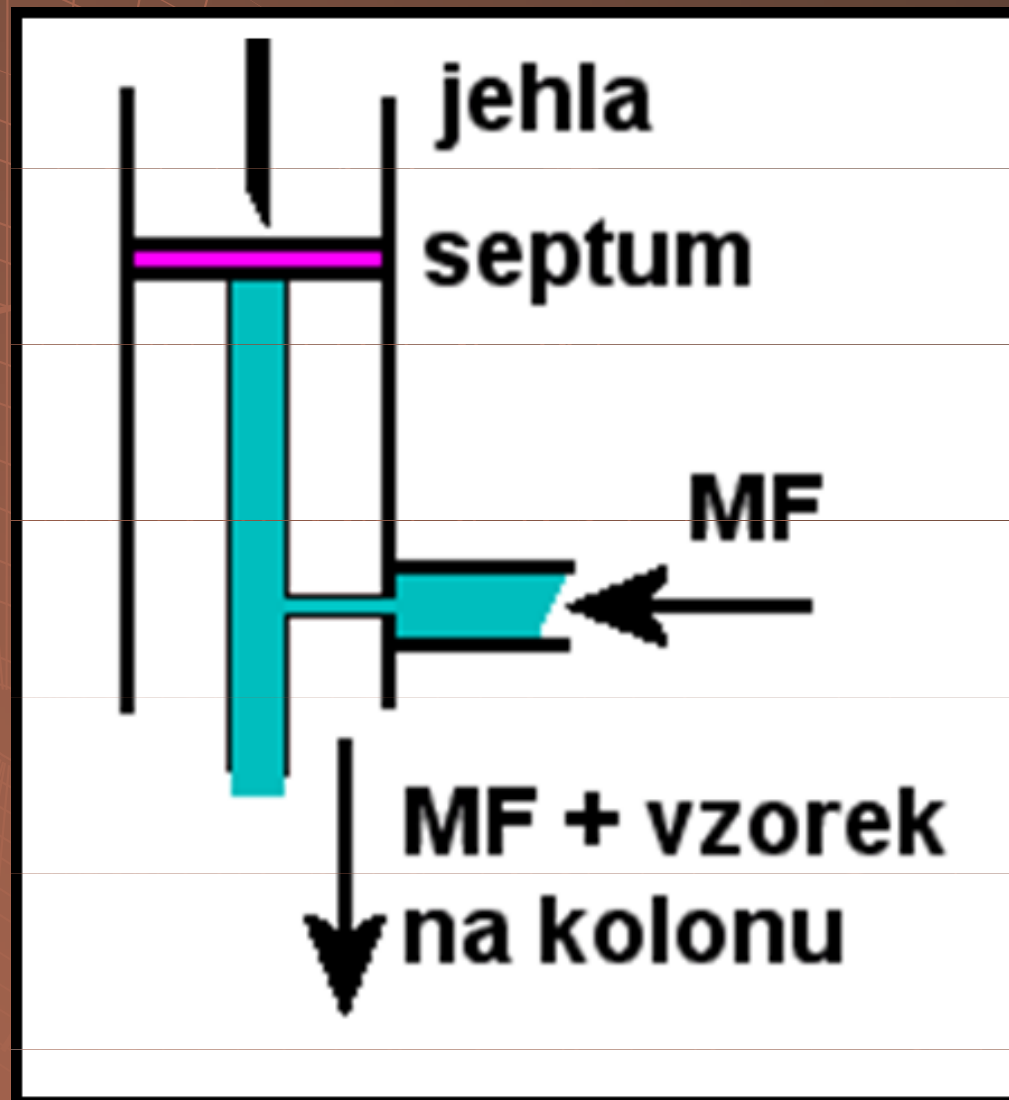
# Gradient nízkotlaký



# Gradient vysokotlaký

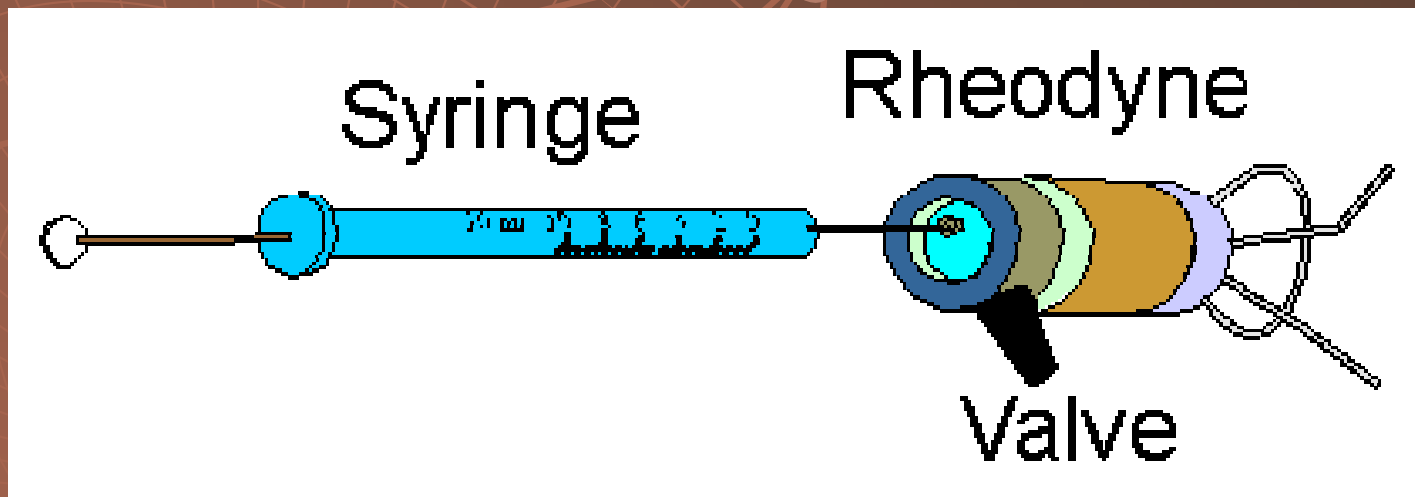


# Dávkování – septum

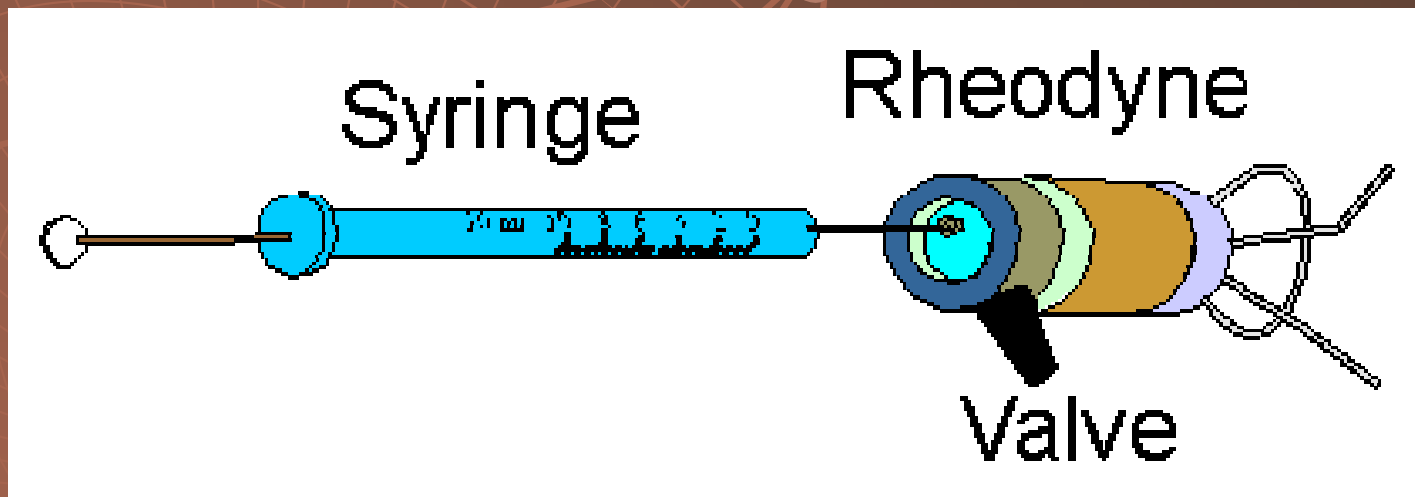




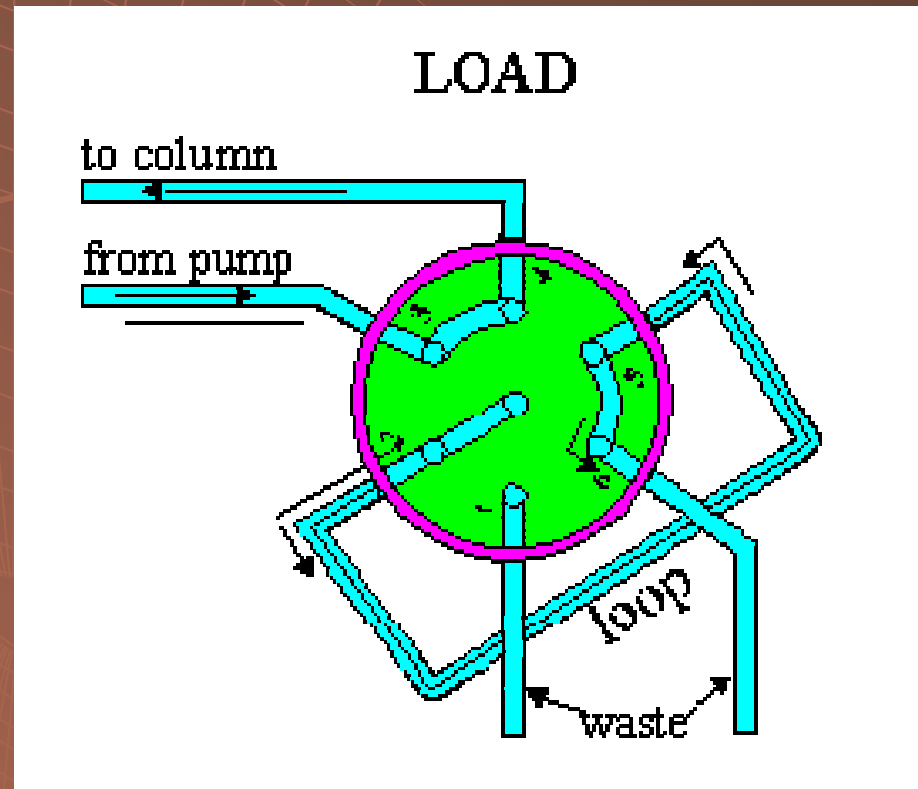
# Dávkování – dávkovací ventil



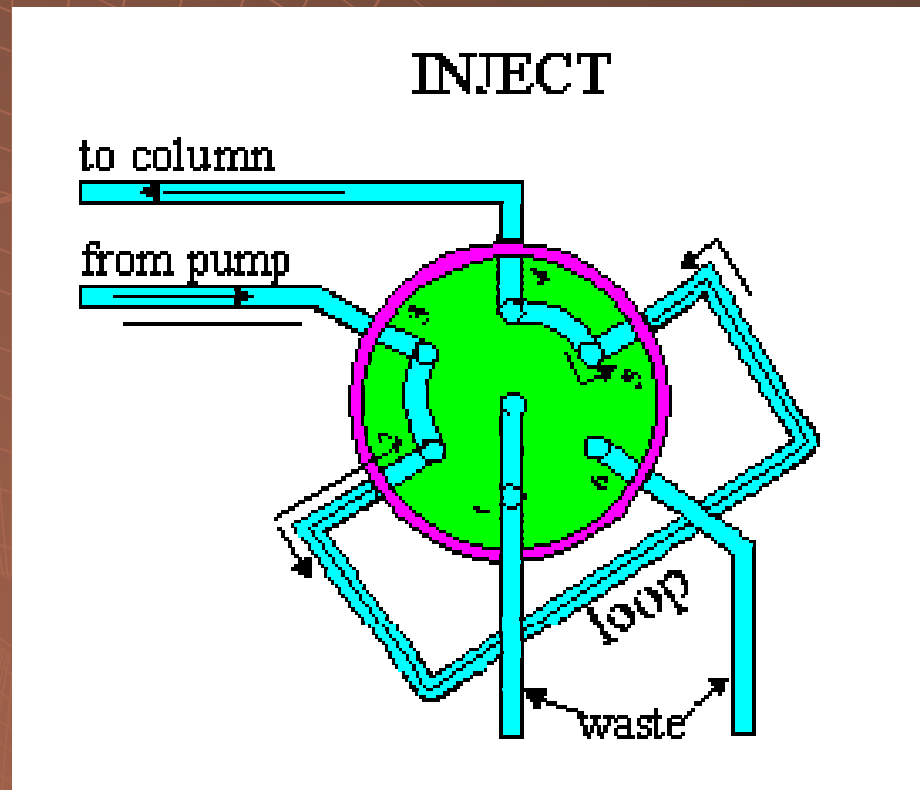
# Dávkování – dávkovací ventil



# Dávkovací ventil – „Load“



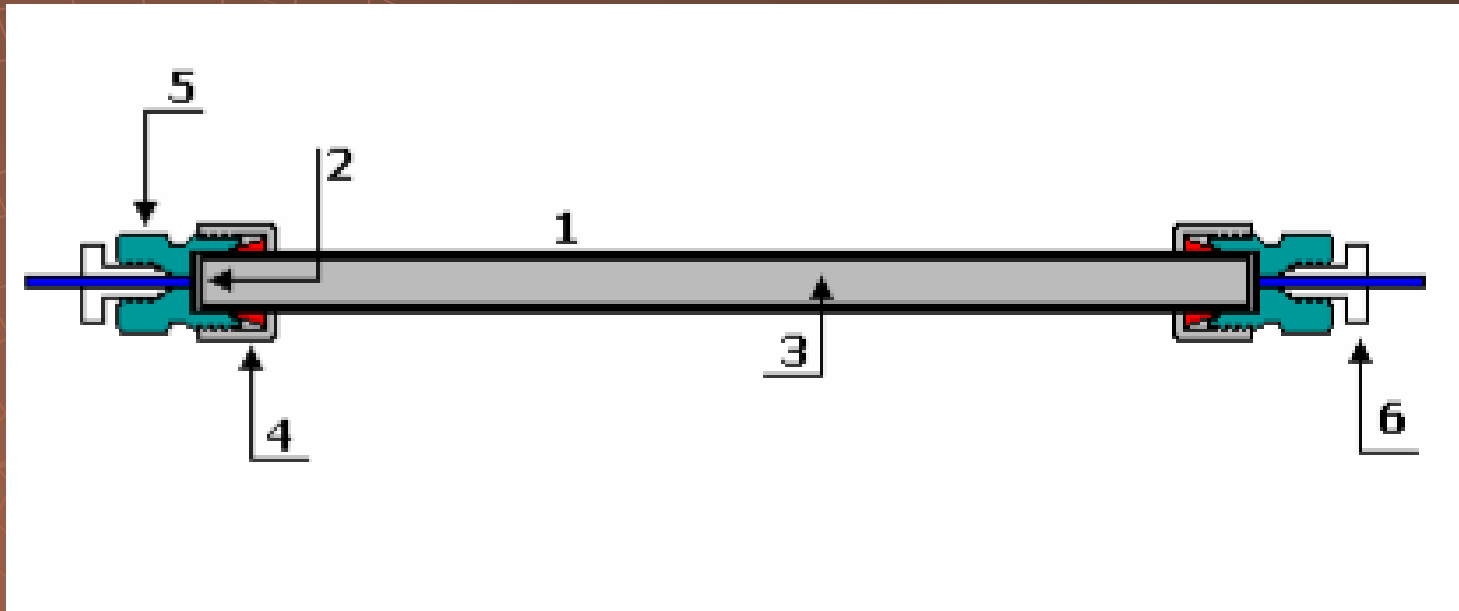
# Dávkovací ventil – „Inject“



# Kolony pro FPLC



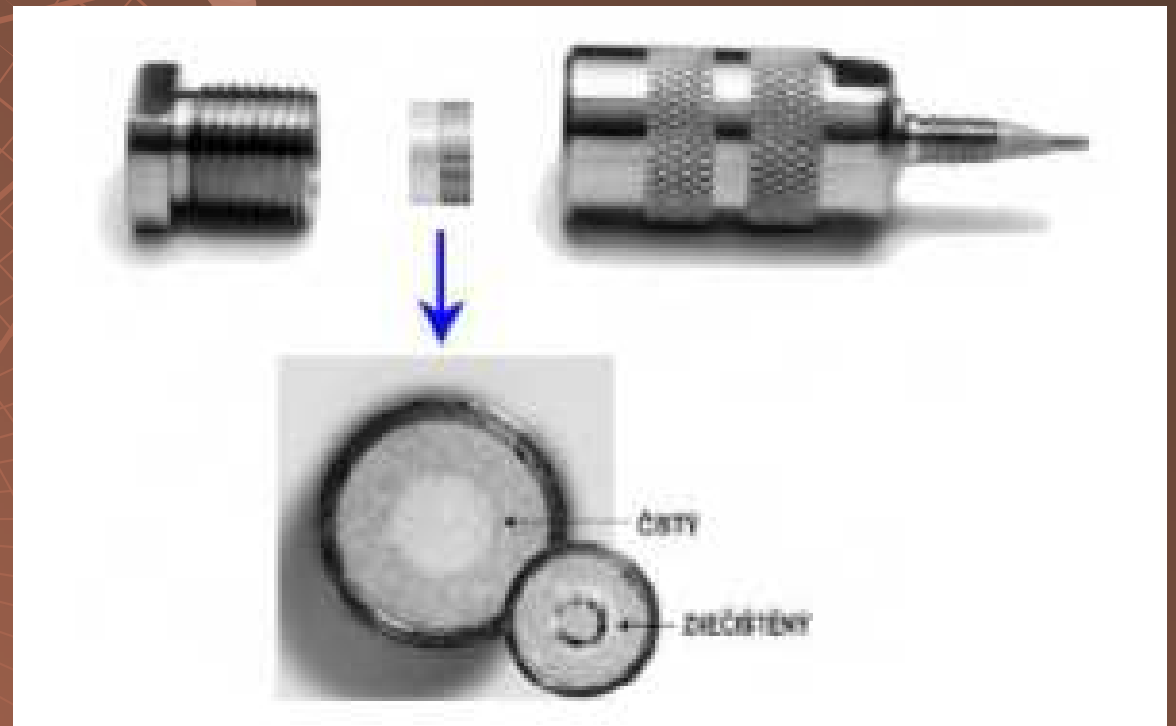
# Kolona



1. kovový plášť
2. Porézní kovová frita
3. Stacionární fáze
4. Převlečný ochranný kroužek
5. Koncová hlavice
6. vstup pro kapiláru se šroubem



# Předkolona



# Kolony pro HPLC a UPLC

<b>Chromatografie</b>	<b>Vnitřní průměr kolony</b>	<b>Průtok</b>
Open Tubular LC	<25 $\mu\text{m}$	<25 nL/min
Nano HPLC	25-100 $\mu\text{m}$	24-4000 nL/min
Kapilární HPLC	100-100 $\mu\text{m}$	0.4-200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Mikro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Klasická HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min
Preparativní HPLC	>10 mm	> 20 mL/min

# Kolony pro HPLC a UPLC



# Kolony pro nano- a kapilární HPLC



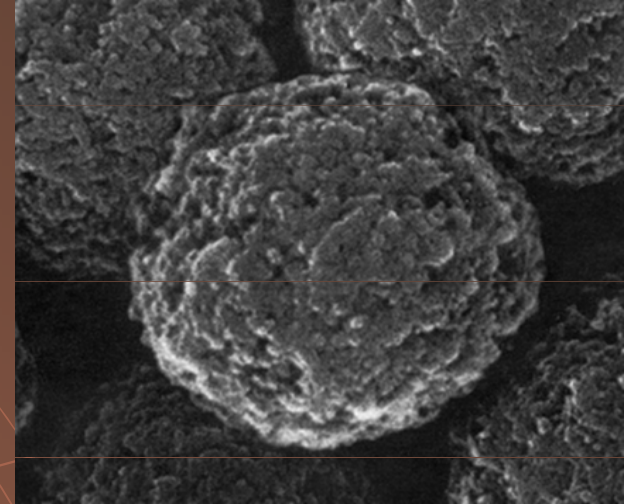
# Částicový sorbent

**tvar:** sférický (bez povrchových vad)

**rozměr pro kolony:**

*analytické* 1 – 8  $\mu\text{m}$

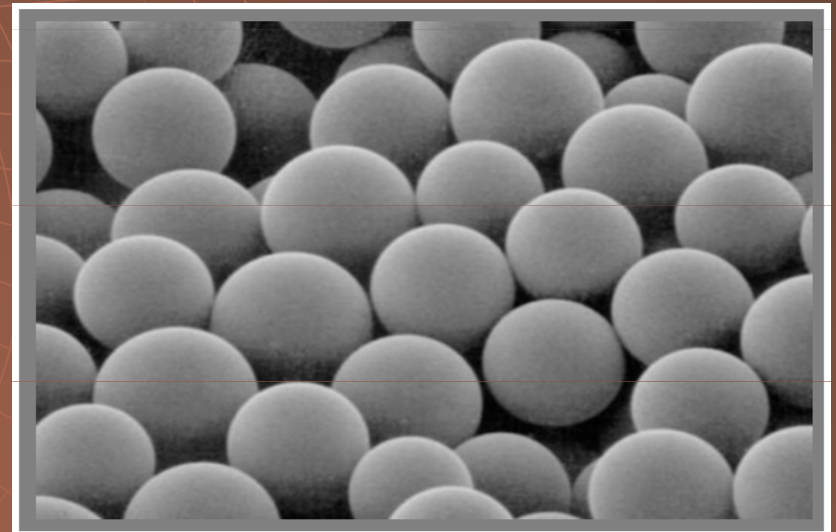
*preparativní* > 10  $\mu\text{m}$



**povrchové rozrůznění**

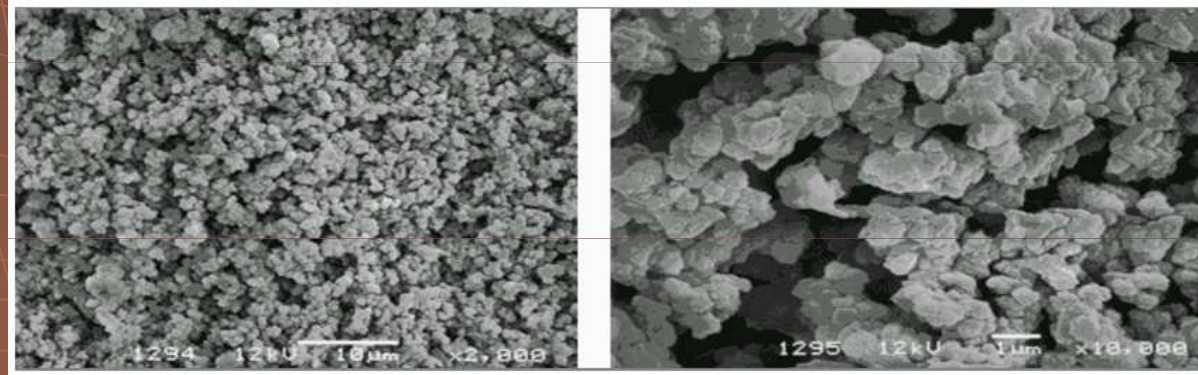
**póry**

**polymerní částice**





# Monolitický sorbent



makropóry:  $\sim 1500$  nm; mezopóry:  $< 50$  nm,  
mikropóry  $< 2$  nm

pórovitost monolitické stacionární fáze až 85 %;  
oproti částicové s pórovitostí *max* 60 %

vysoké průtoky za nízkých tlaků;  
velká efektivní plocha  $\Rightarrow$  rychlá separace:  
vysoké rozlišení a vysoká kapacita



# monomer + polymerační činidlo + porogen

## ML-SF na bázi siliky

tetramethoxysilan (TMOS)

tetraethoxysilan (TEOS) + kyselina octová + polyethylenglykol (PEG)

## ML-SF na bázi organických materiálů

styren-divinylbenzen (S-DVB)

metakryláty

vinyl-deriváty (vinylpyrrolidon, vinylacetát)

izooktan

tetrahydrofuran

dekanol

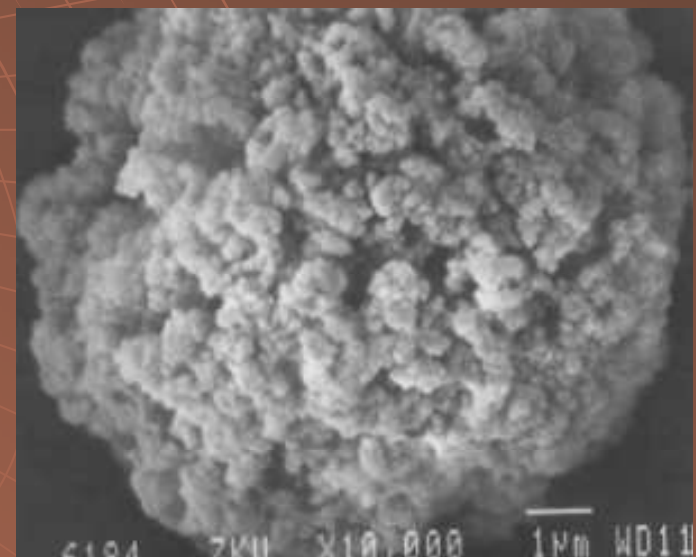
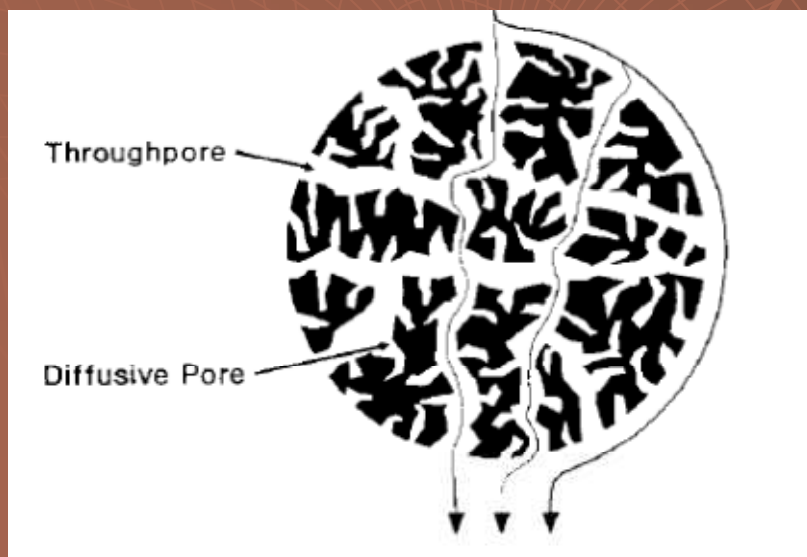
**nevýhoda: obtížná výroba**

**provedení: disk, trubička, plněná kapilára**

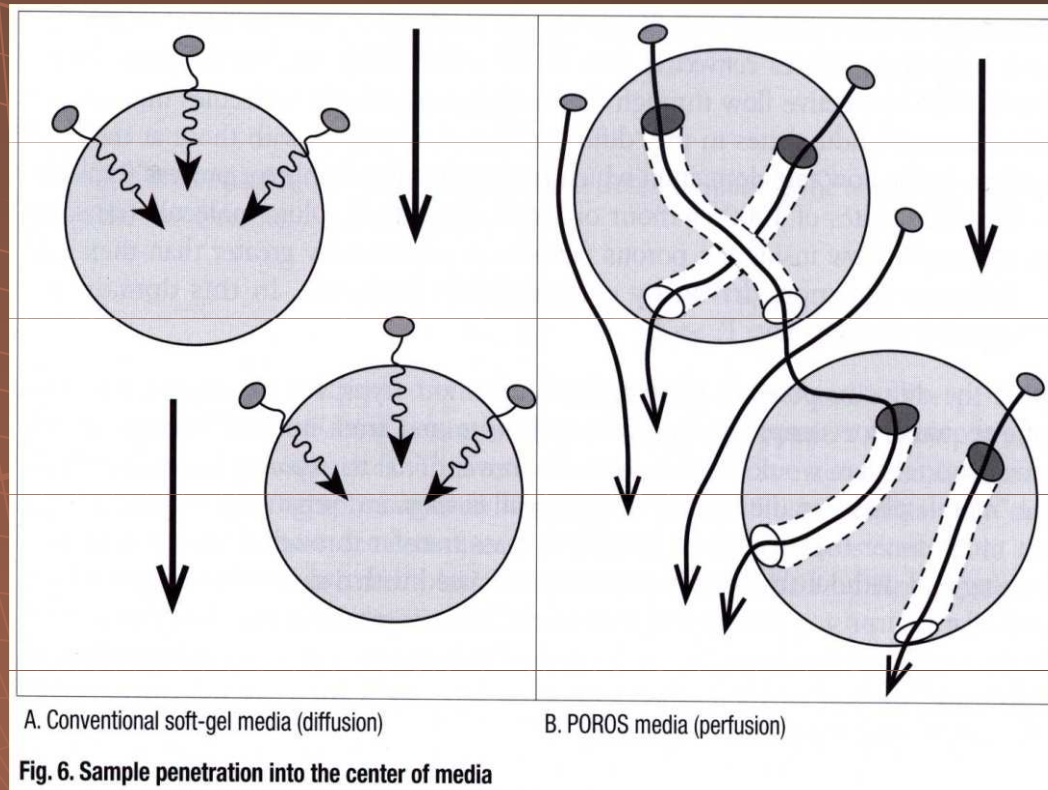


# Perfúzní chromatografie

- ◆ Využívá médií - **POROS média**, jejichž částice (10, 20, 50  $\mu\text{m}$ ) mají velké příčné póry - 600 - 800 nm. Molekuly biopolymerů unášené **konvektivním prouděním** mobilní fáze se těmito póry lehce dostávají do nitra částic. Příčné póry jsou navíc vzájemně propojeny krátkými “difuzními” póry - 50 – 150 nm. Vytváří se tak síťová struktura s rozsáhlým vnitřním prostorem pro interakci nosiče s biopolymerem.



# Perfúzní chromatografie - princip



Průtokem mobilní fáze vytváří napříč každou částicí média rozdíl tlaku, který indukuje **konvektivní tok příčnými póry (perfúze)**. Biomakromolekuly ve vzorku se tak dostávají do kontaktu jak s povrchem částic, tak i s vazebnými místy v jejich nitru.



# Perfúzní chromatografie

K efektu perfúze dochází jen při určité průtokové rychlosti. Moderní HPLC a FPLC systémy mohou zajistit podmínky perfúze pouze u malých analytických POROS kolon (4.6 x 100 mm, objem 1.7 ml, při průtokové rychlosti kolem 10 ml.min<sup>-1</sup>).

- ◆ Výhody ve srovnání s chromatografií konvenční:
  - Kapacita je vysoká, nezávisí na průtokové rychlosti.
  - Rozlišení je vysoké, nezávisí na průtokové rychlosti.
  - Rychlost separace je obvykle 10 - 100x větší než u konvenčních médií, řádově se pohybuje v minutách.

# Perfúzní chromatografie - princip

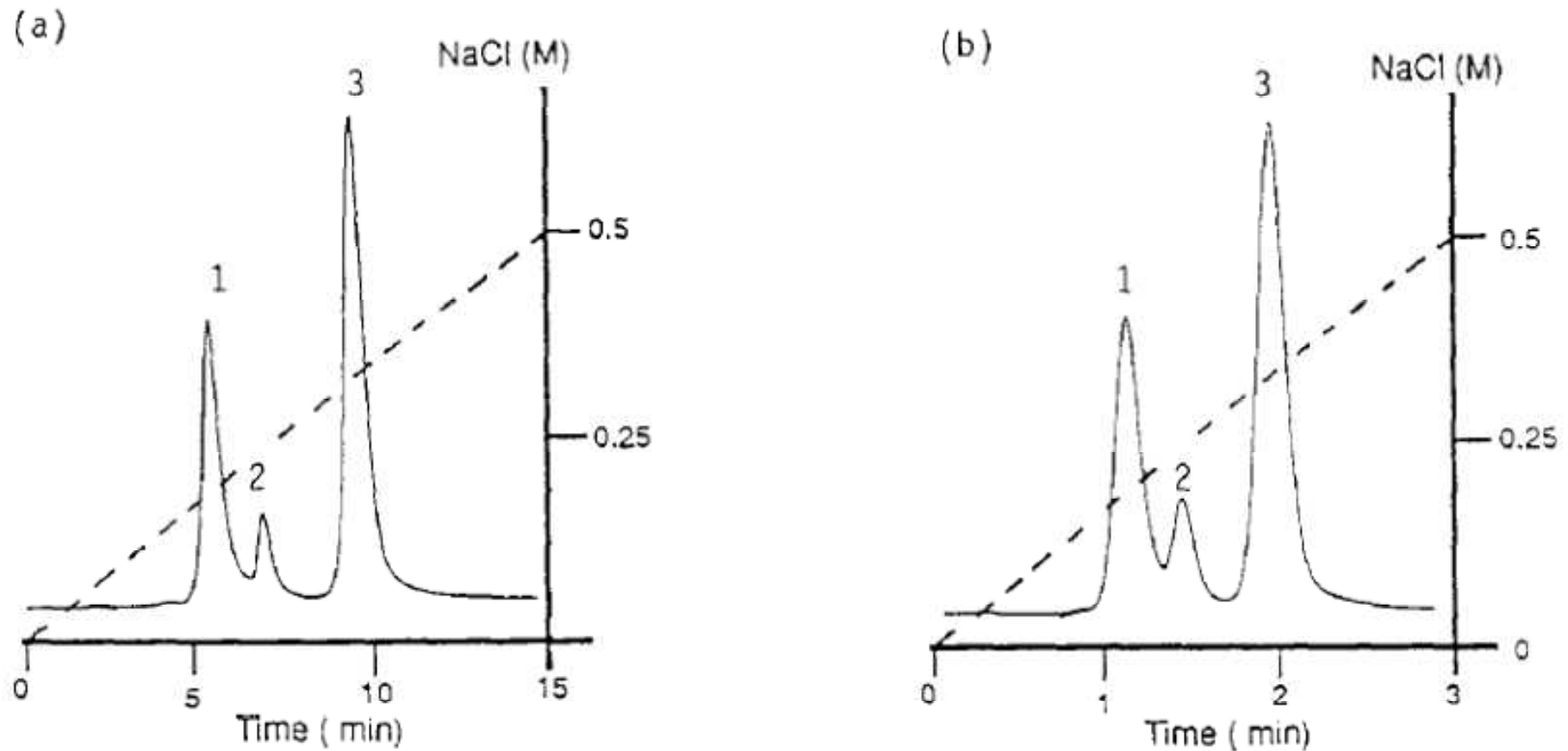
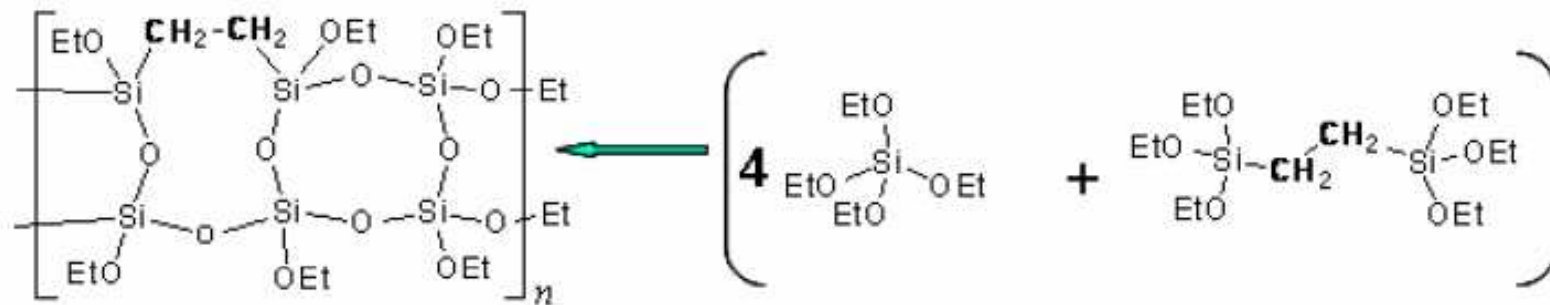


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75  $\mu\text{g}$  load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100  $\times$  4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min, 15-min gradient to 0.5 M NaCl; (b) 5 ml/min; 3-min gradient to 0.5 M NaCl.

# UPLC stacionární fáze Waters

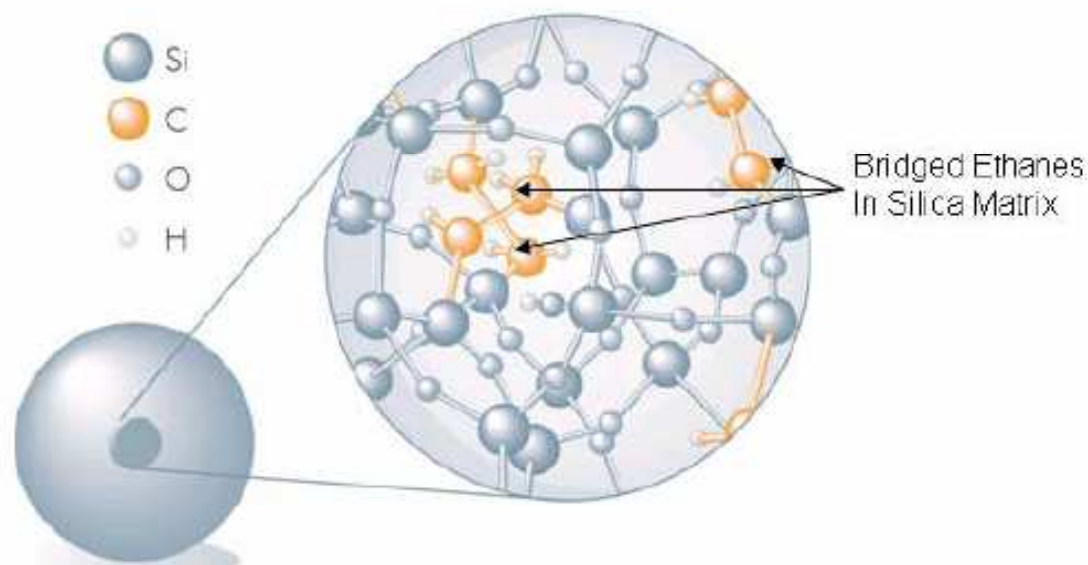
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



Polyethoxysilane (BPEOS)

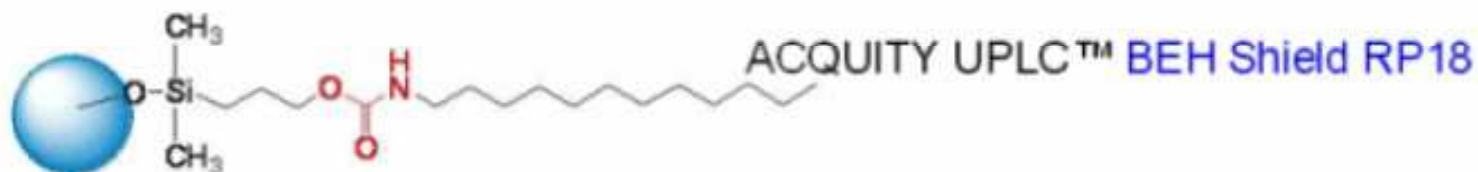
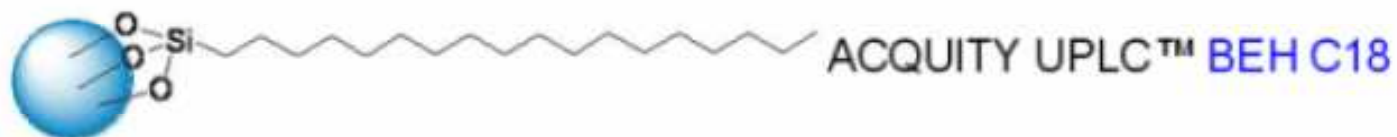
Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)



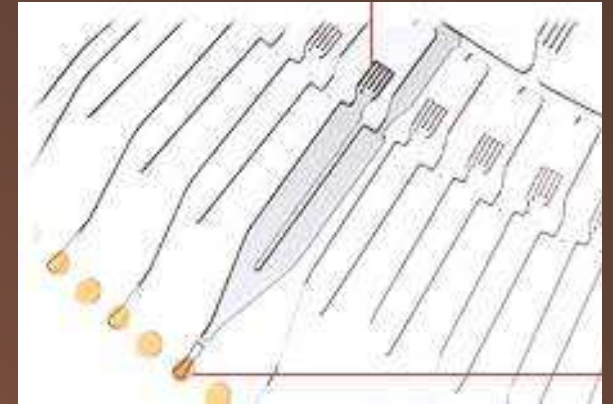
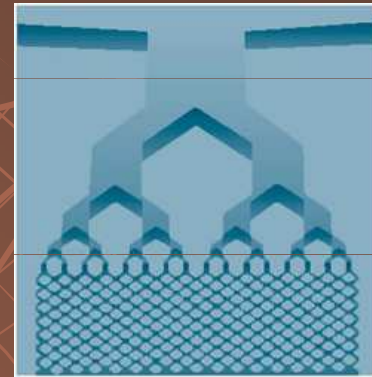
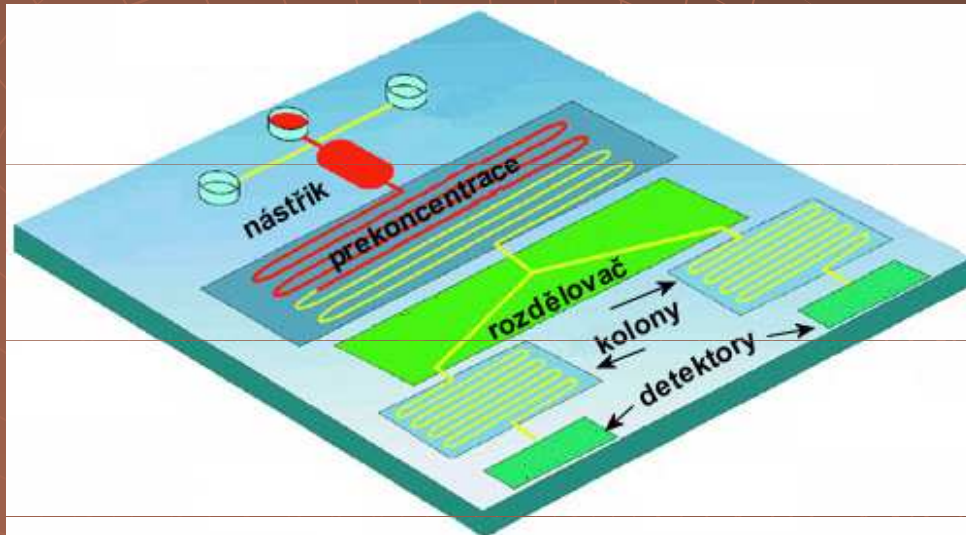


# UPLC stacionární fáze Waters



# Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

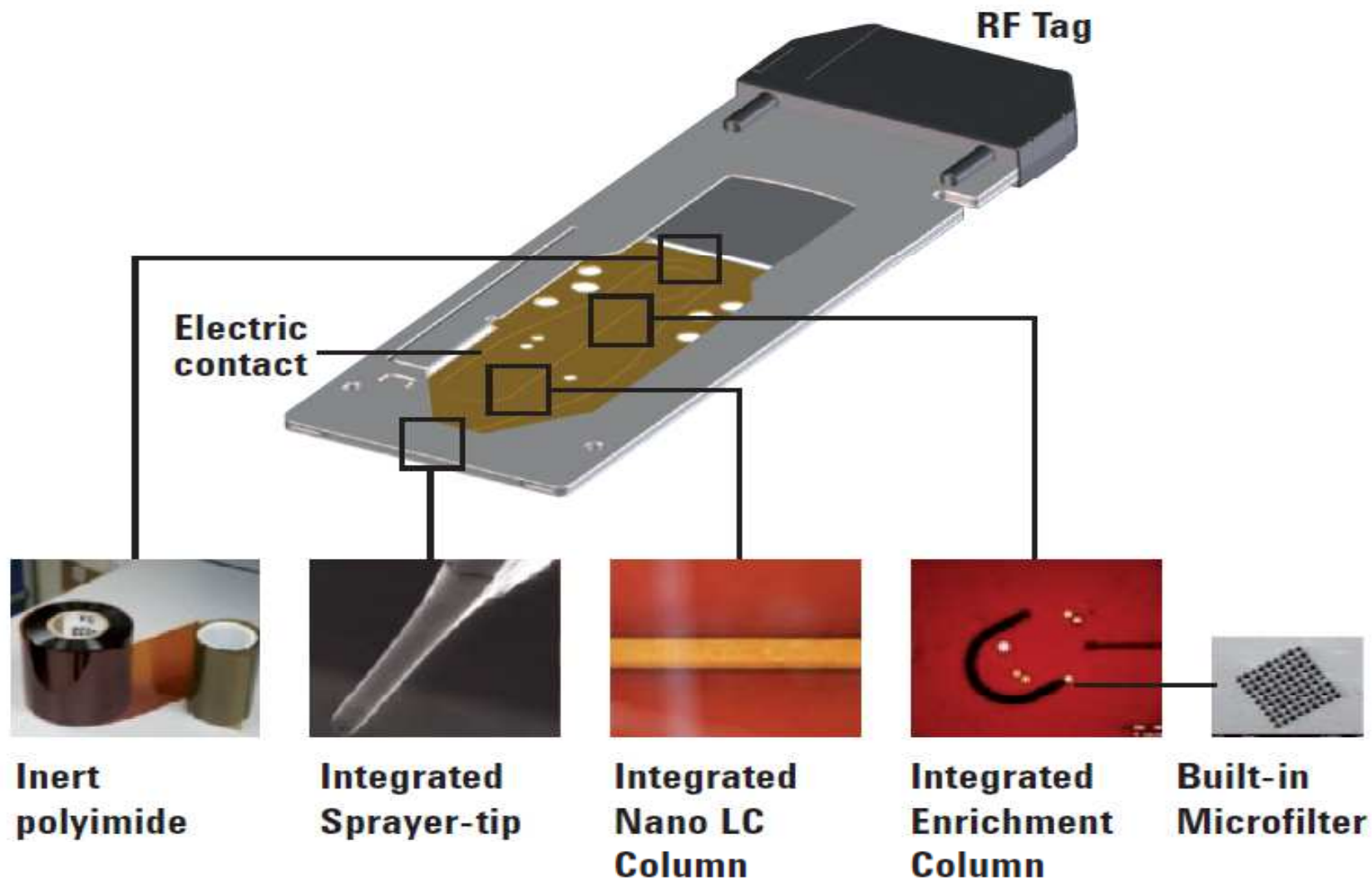


**doprava MF:** pumpa, odstředivá síla, el. staticky

**výhody:** rychlost analýzy, velikost,  
malá spotřeba vzorku (< nl !)

**nevýhody:** práce s malými objemy  
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

# Chipová chromatografie Agilent



# Chipová chromatografie Agilent







Průmyslové systémy



# Detektory



# Detektory

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	nedeštruktivní	nedeštruktivní	nedeštruktivní	nedeštruktivní	deštruktivní	nedeštruktivní	deštruktivní	deštruktivní
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivost (hmotnost/ml)	μg	ng	μg	pg	pg	ng	ng	μg
lineární rozsah	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 <sup>-4</sup> jed. ind. lomu)	nížká	nížká	nížká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nížká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

# Refraktometrický detektor

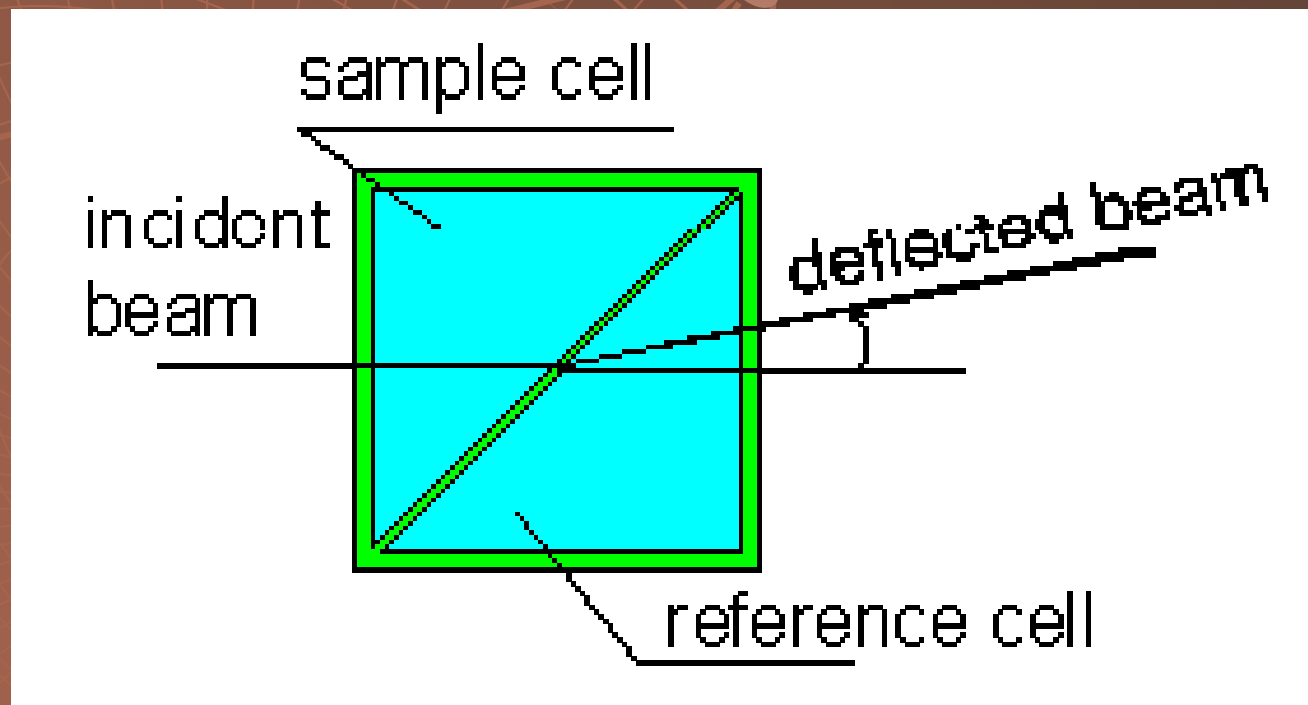
index lomu

**šum**  $10^{-7}$

**dyn. rozsah**  $10^4$

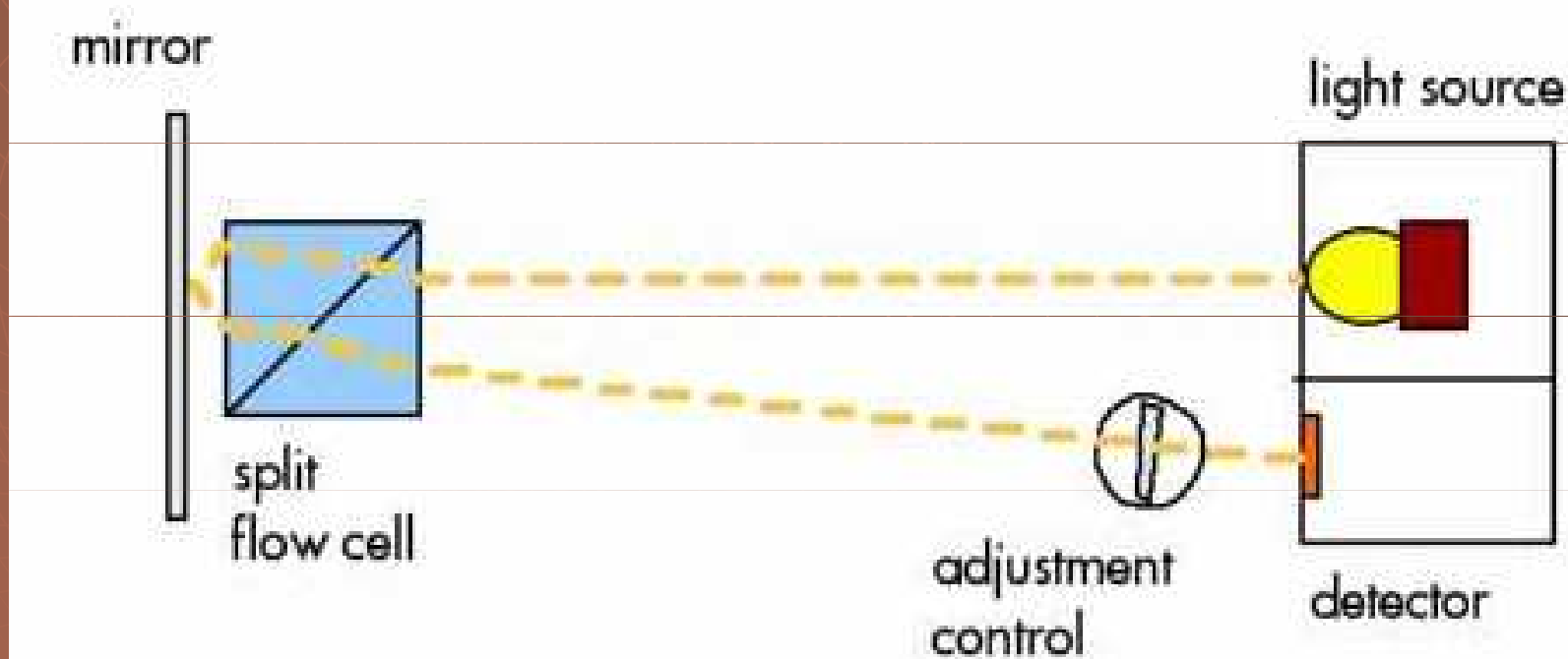
**citlivost**  $10^{-7}$  g/ml

# Refraktometrický detektor



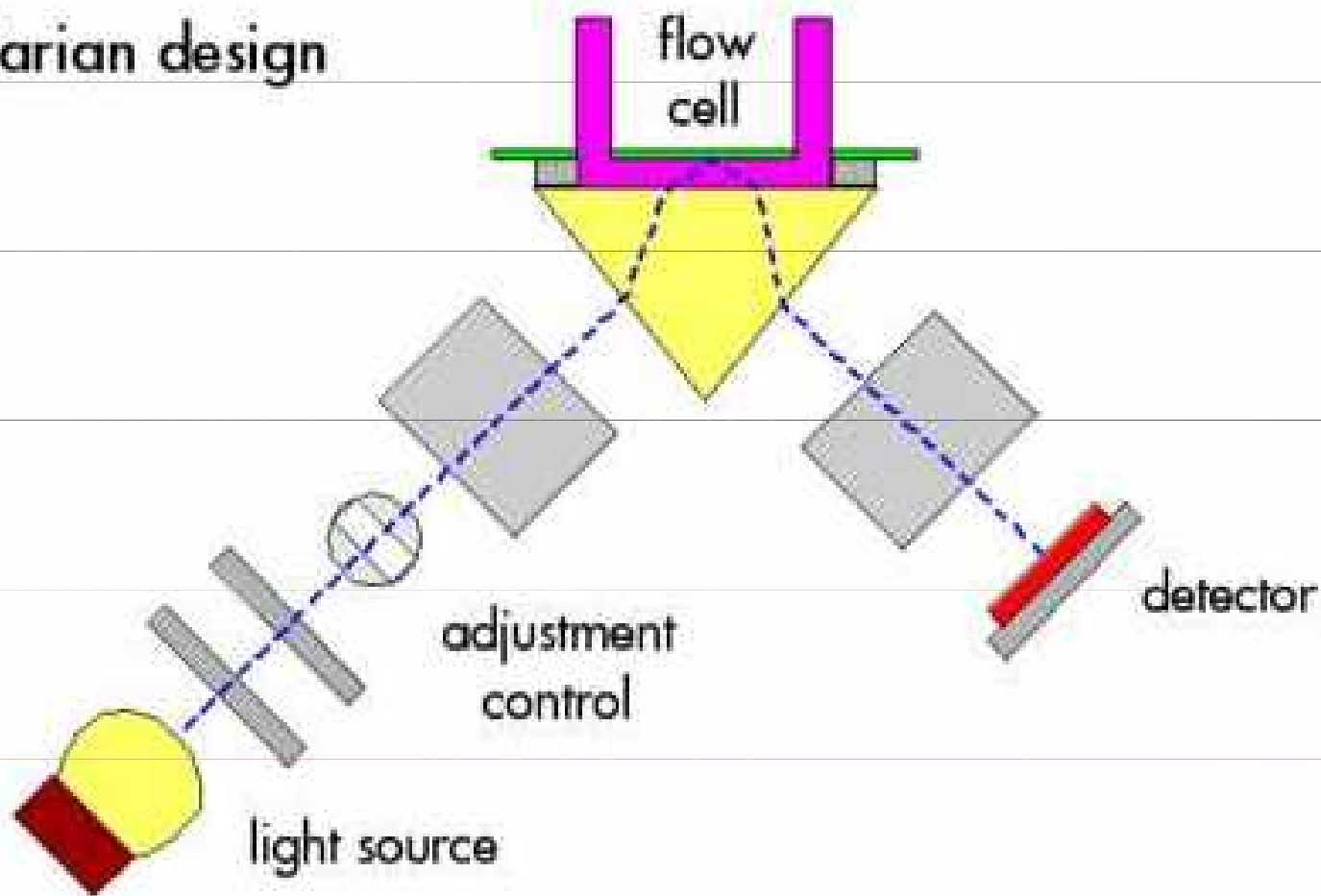
# Refraktometrický detektor

## Waters design



# Refraktometrický detektor

Varian design



# „Light scattering“ detektor

Rozptyl

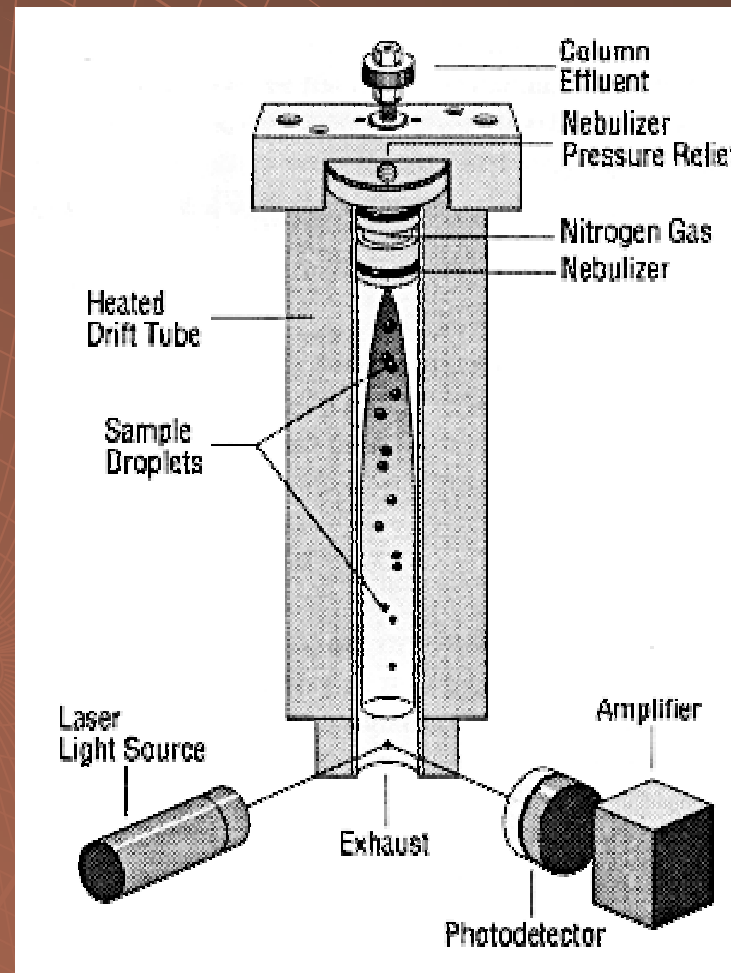
**šum**  $10^{-8}$

**dyn. rozsah**  $10^4$

**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml



# „Light scattering“ detektor



# UV – VIS detektor detekční cela

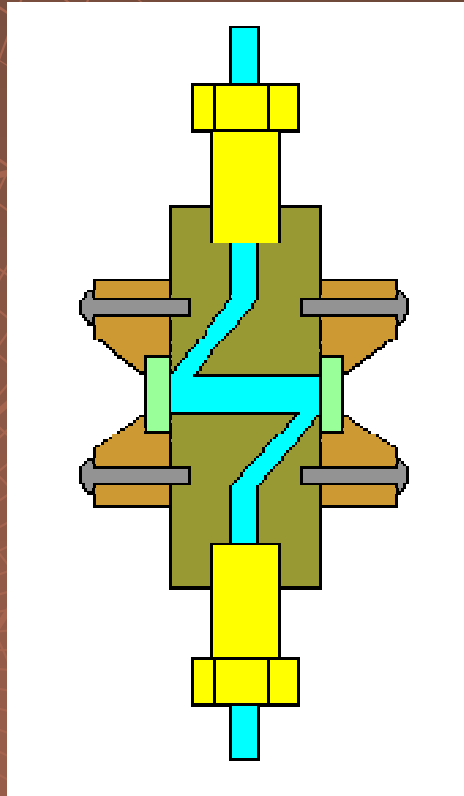
Absorbance

**šum**  $10^{-4}$

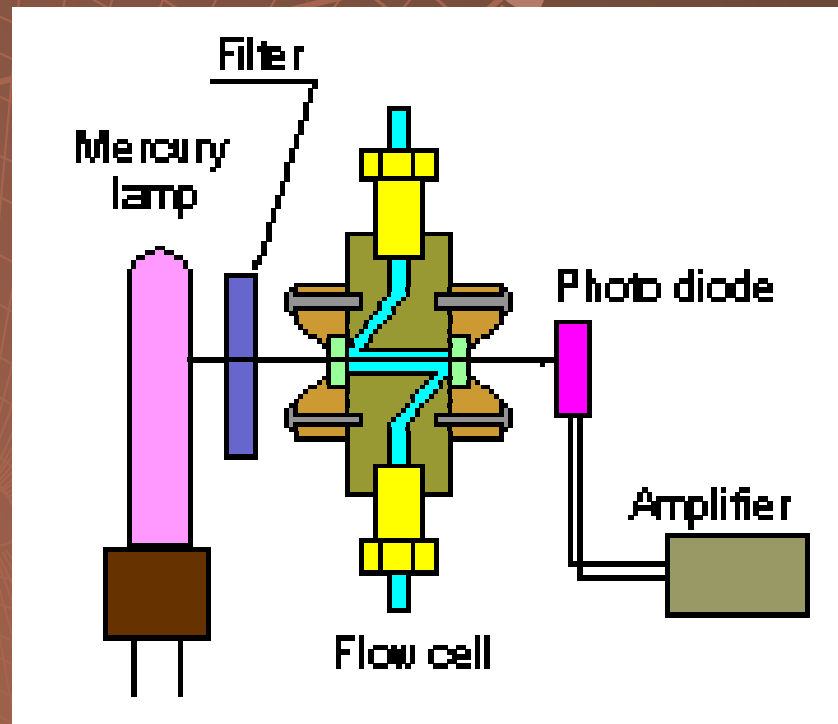
**dyn. rozsah**  $10^4$

**citlivost**  $10^{-10}$  g/ml

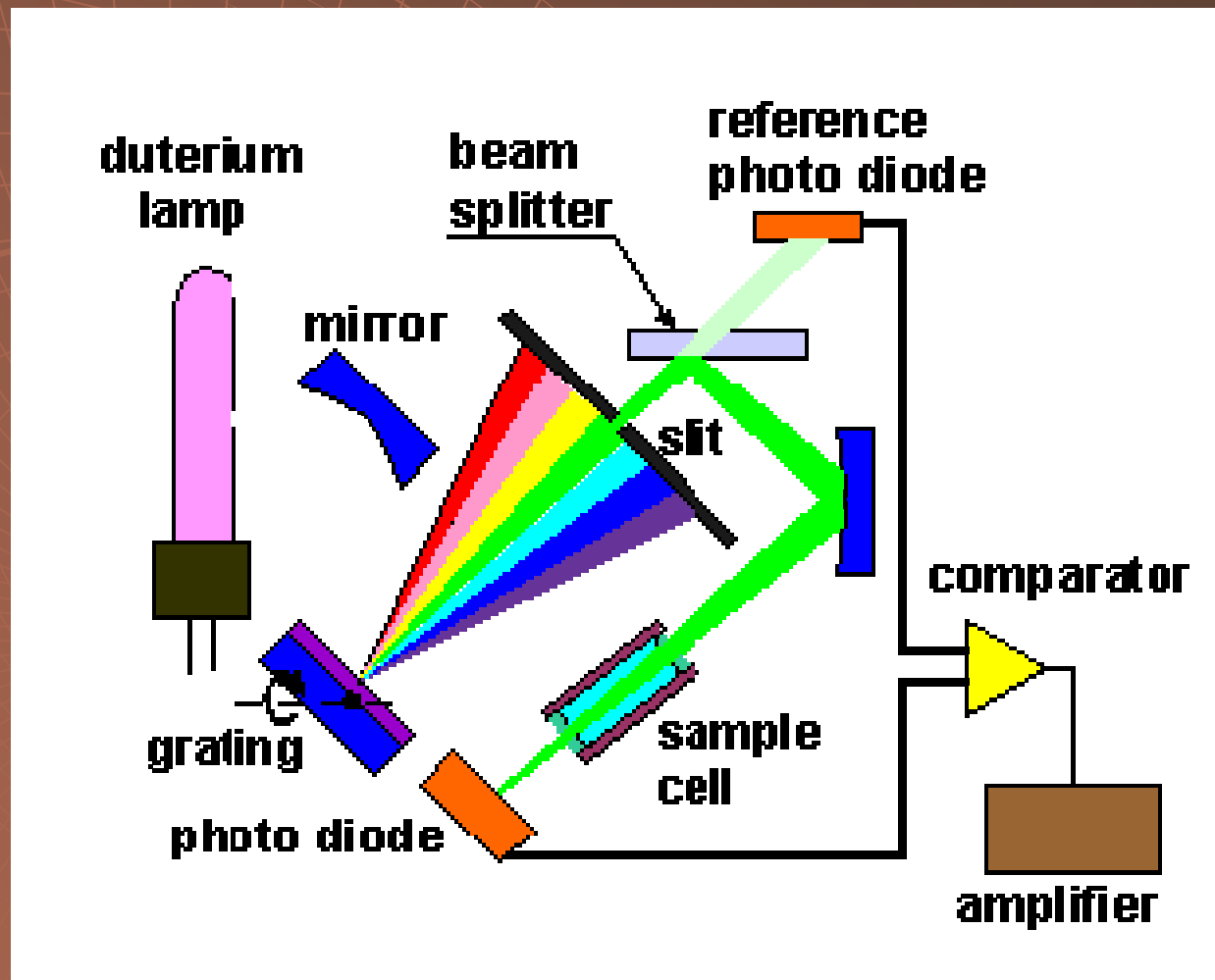
# UV – VIS detektor detekční cela



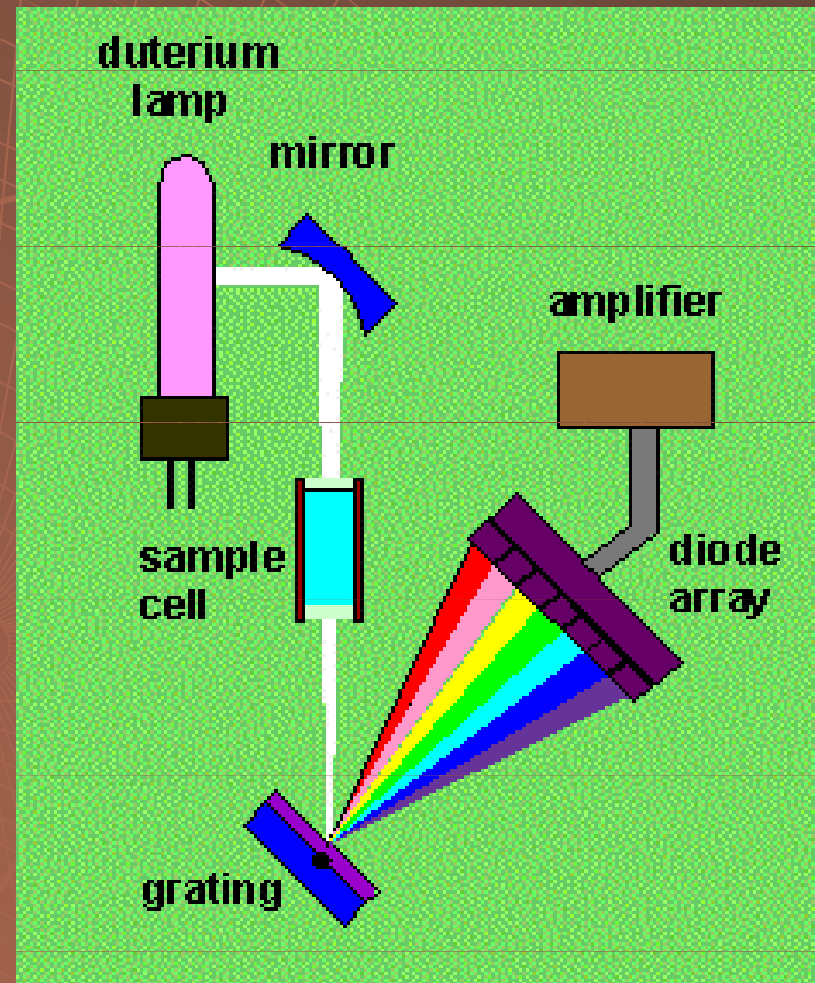
# UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



# UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou

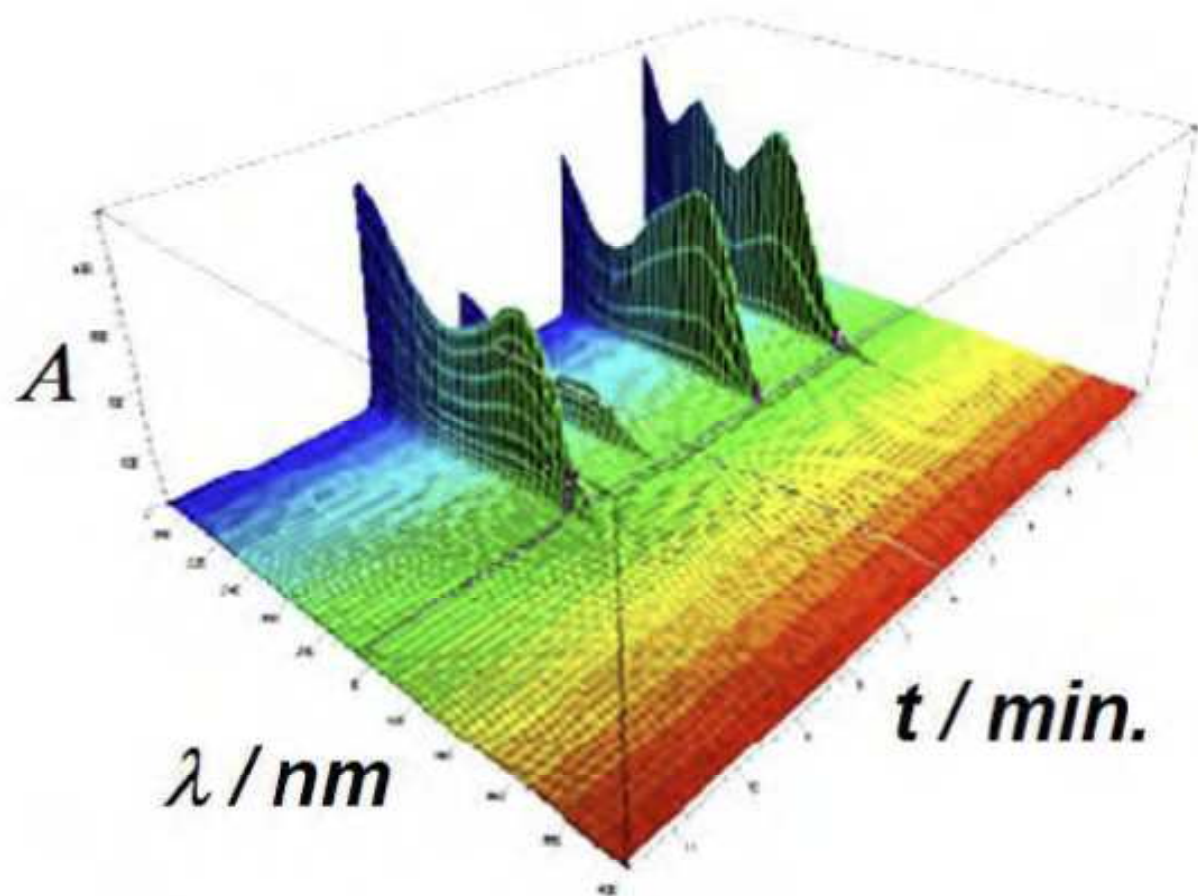


# UV – VIS detektor s diodovým polem





# UV – VIS detektor s diodovým polem

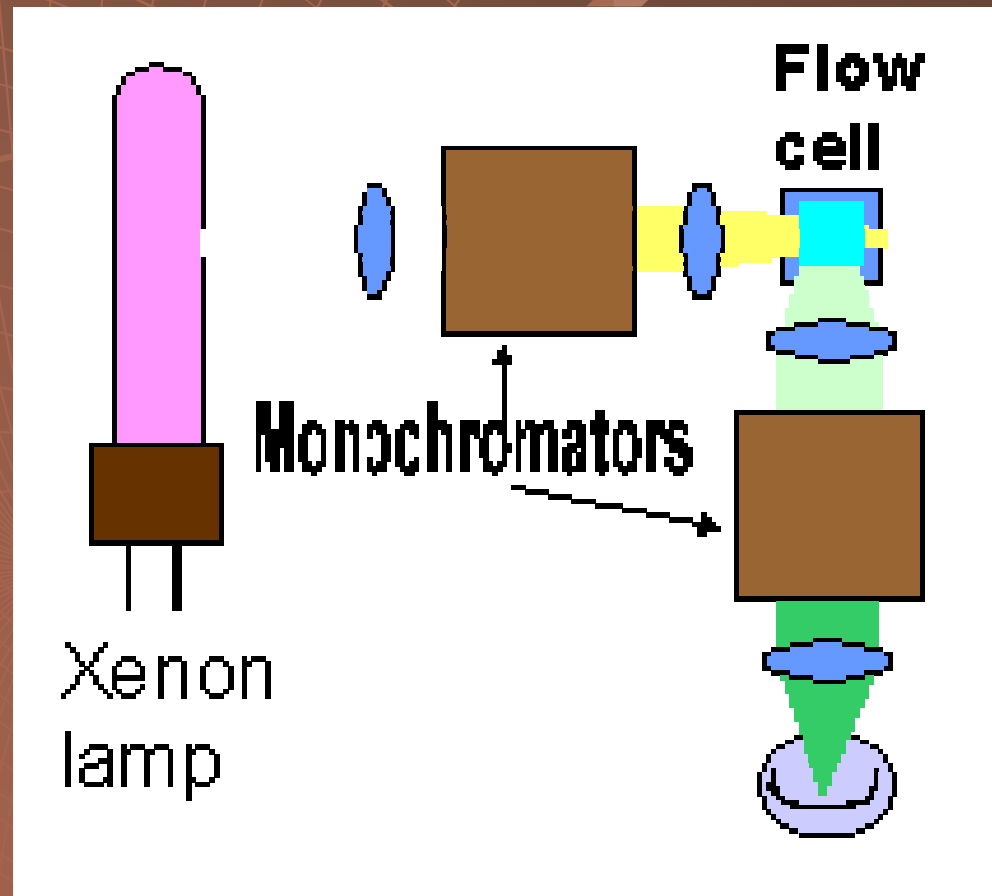


# Fluorescenční detektor

Fluorescence

**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml

# Fluorescenční detektor

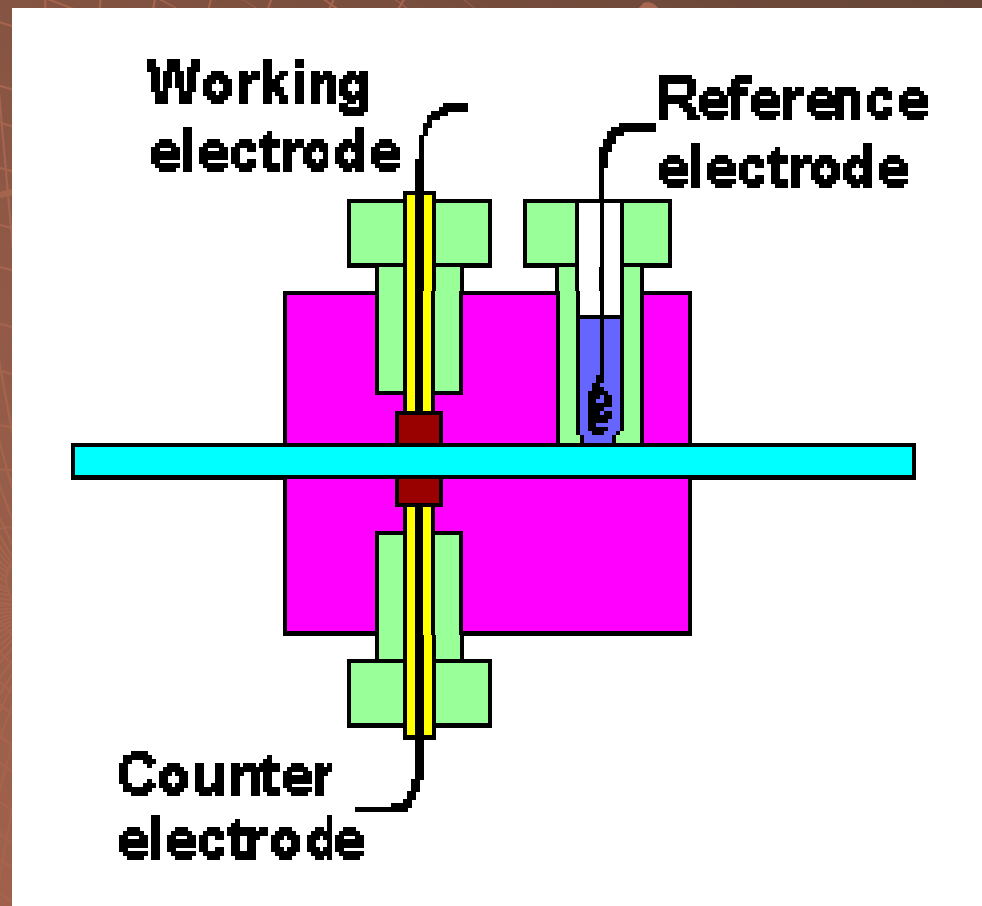


# Elektrochemický detektor

elektrický proud

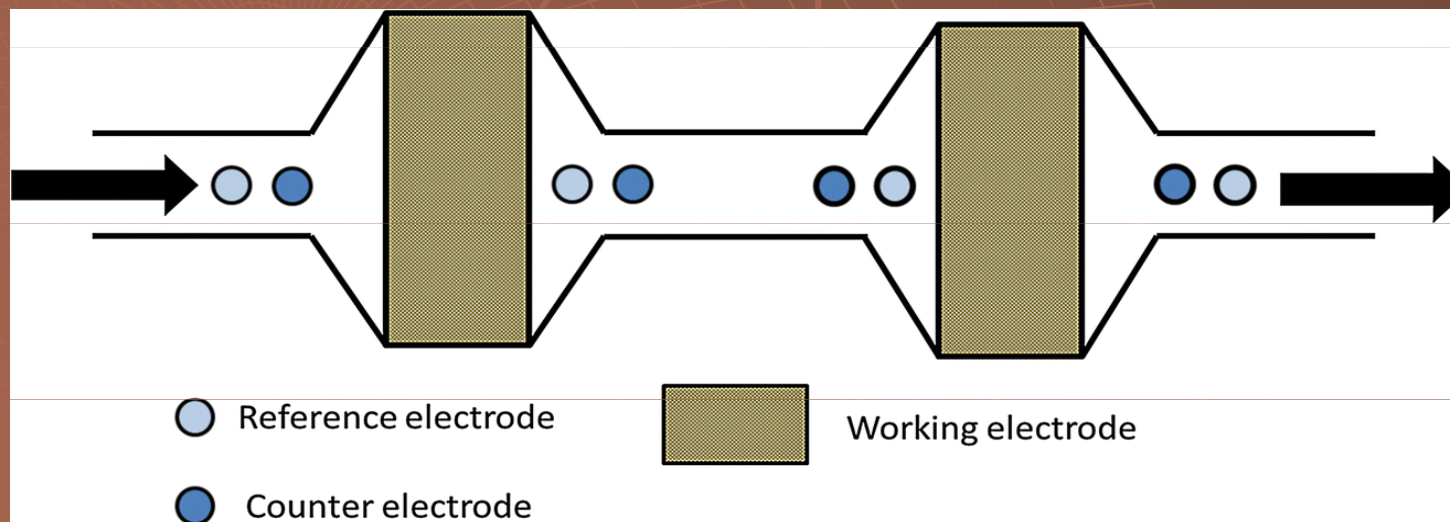
**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml

# Elektrochemický detektor amperometrický



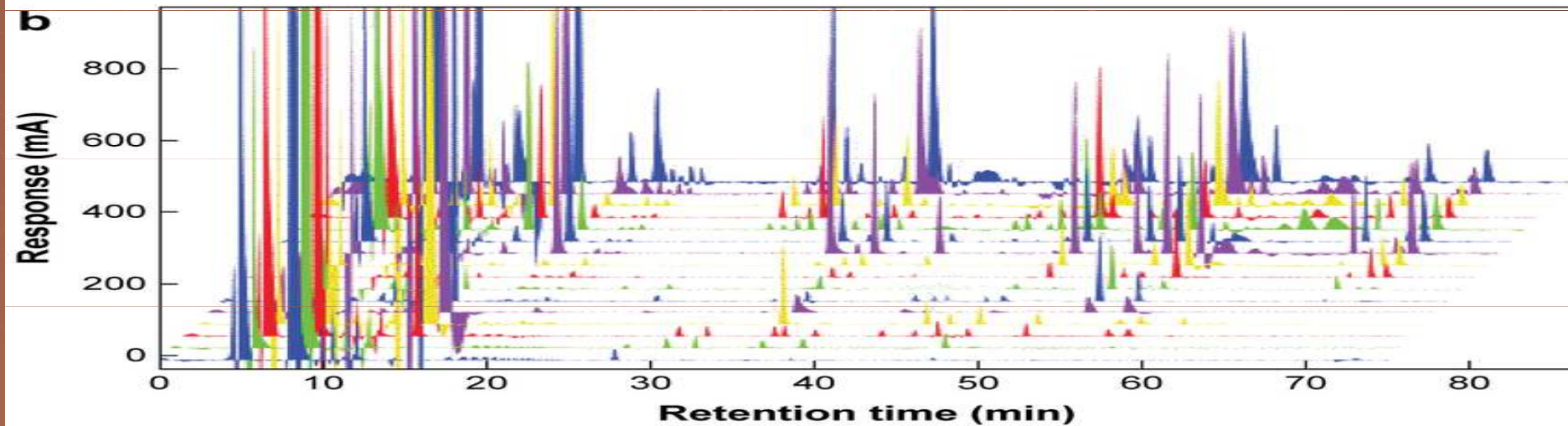
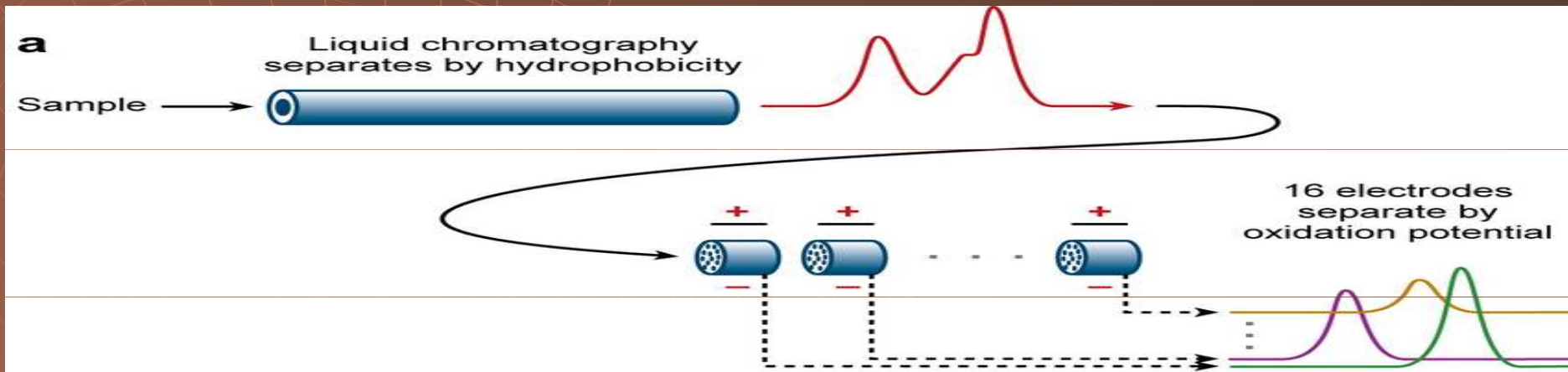


# Elektrochemický detektor coulometrický





# Elektrochemický detektor



Kaddurah-Daouk R, et al. 2008.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48:653–83

# Konduktometrický detektor

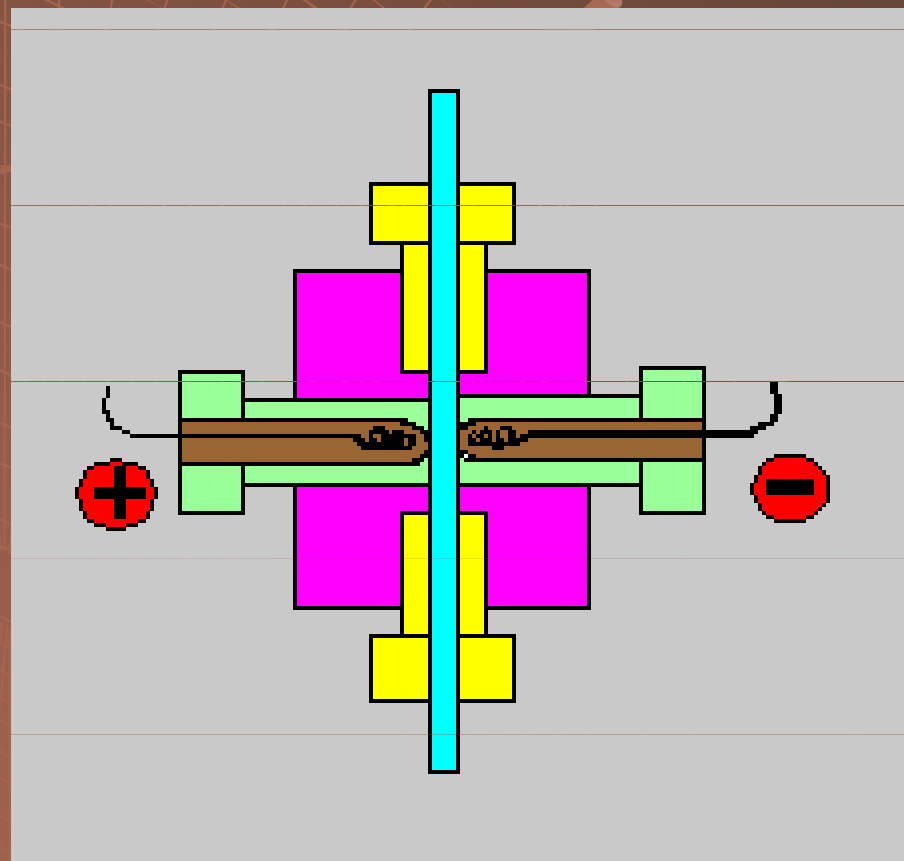
Vodivost

**šum**  $10^{-3}$

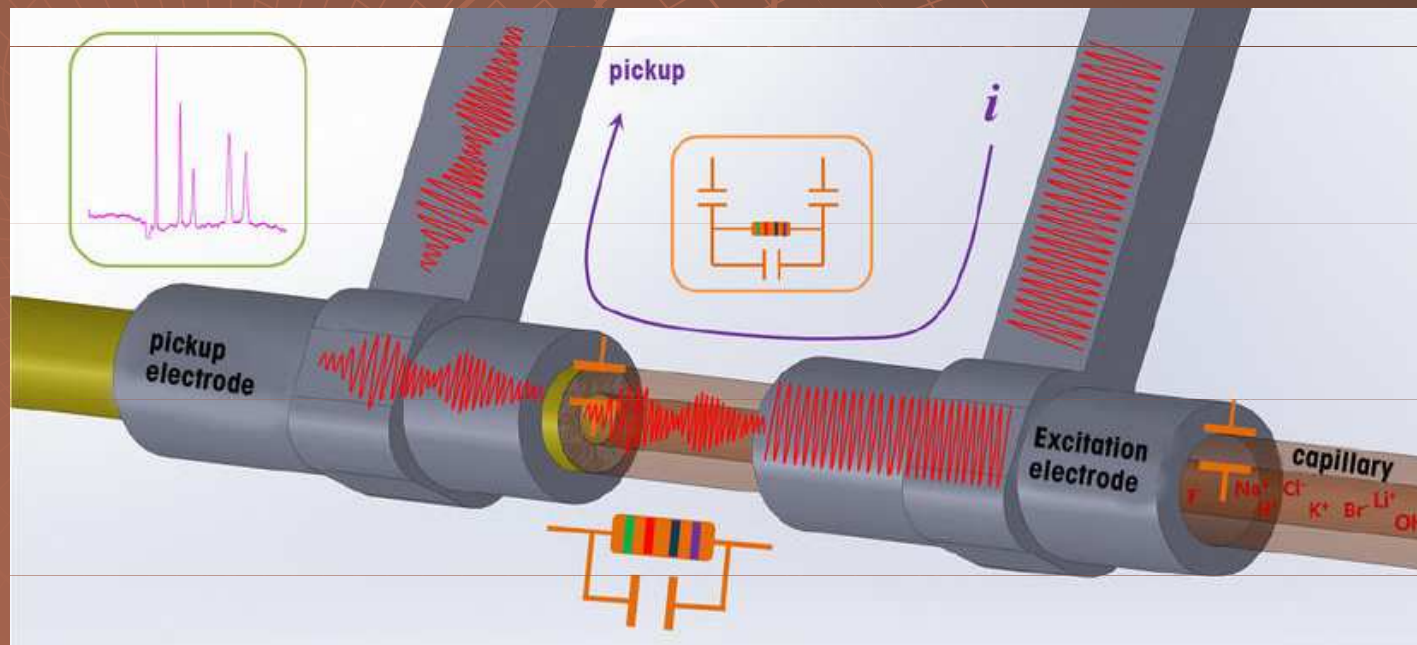
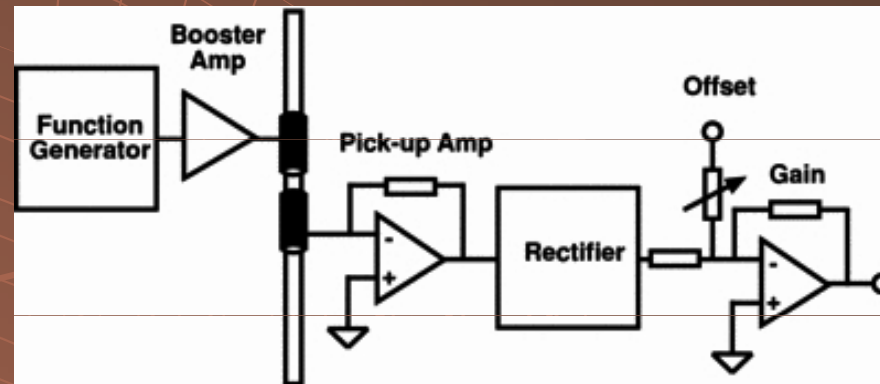
**dyn. rozsah**  $10^6$

**citlivost**  $10^{-8}$  g/ml

# Konduktometrický detektor kontaktní

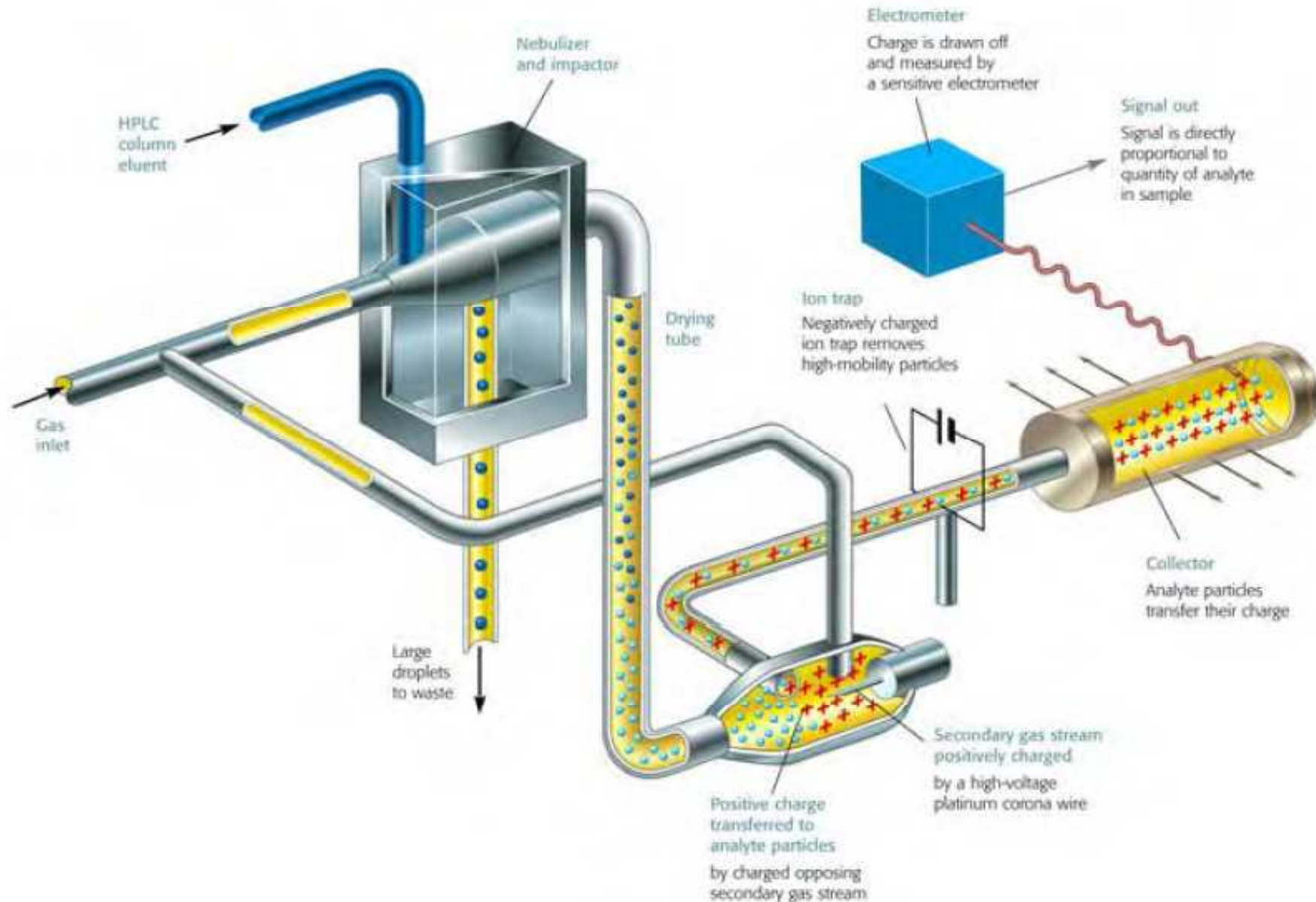


# Konduktometrický detektor bezkontaktní





# Aerosolový detektor nabitých částic



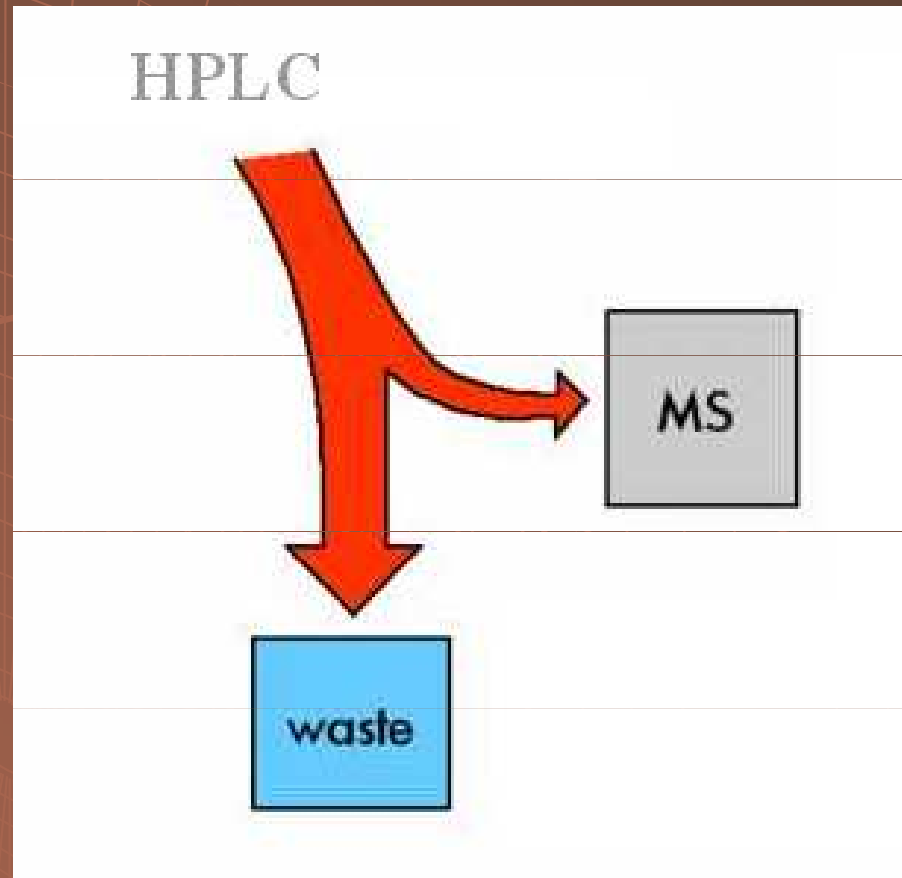
# LC-MS

počet iontů

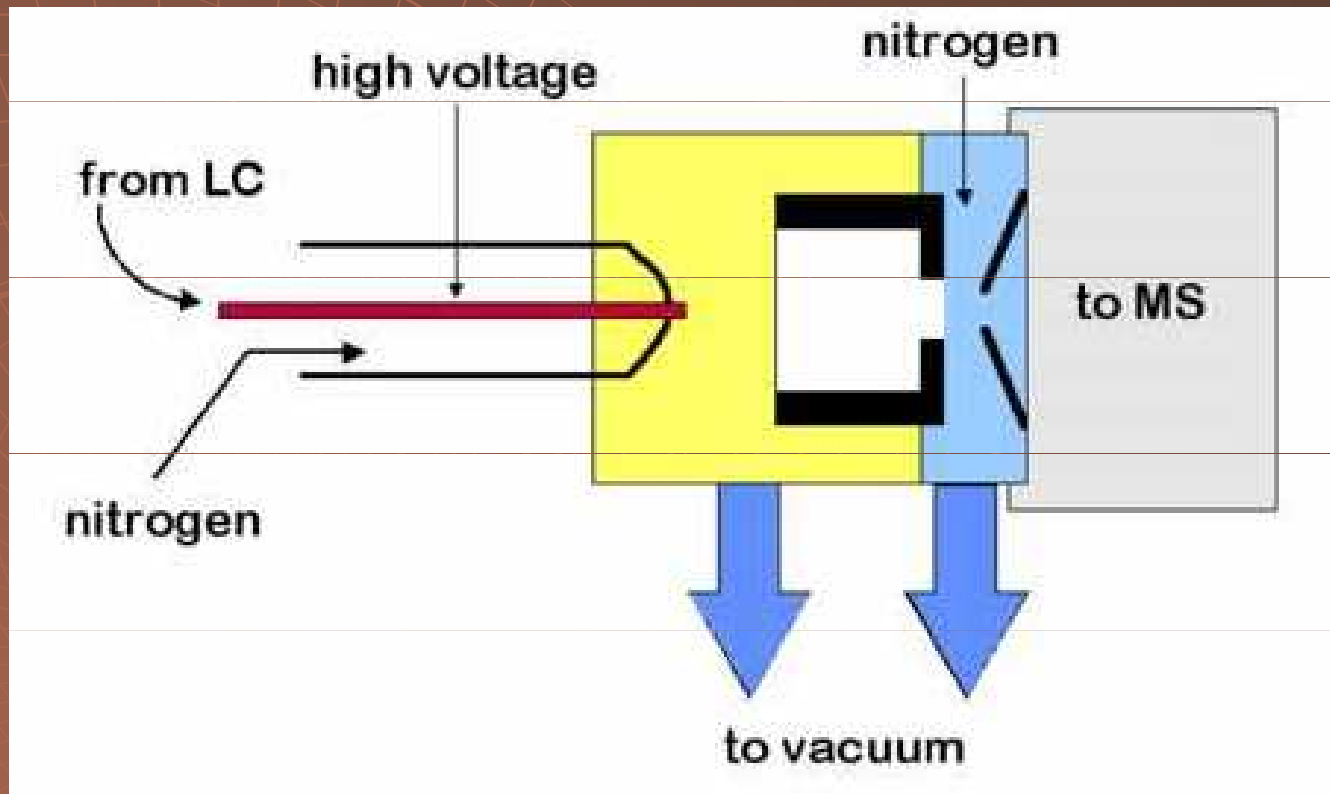
**citlivost**  $10^{-13}$  g/ml



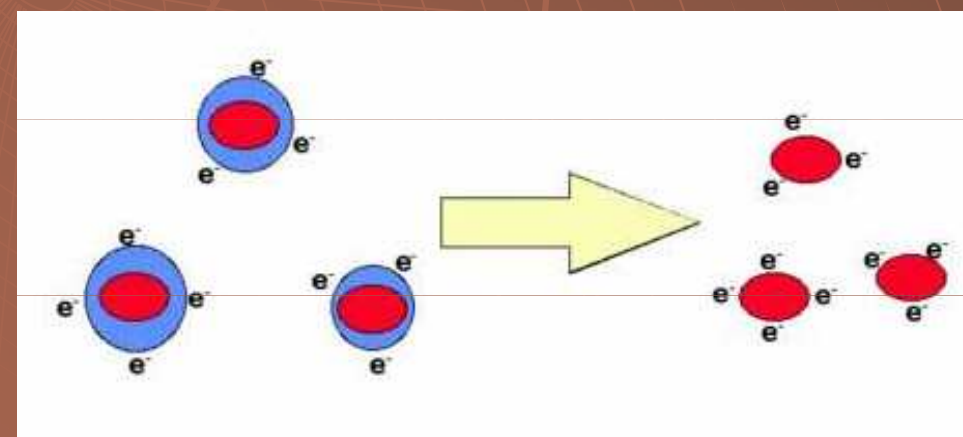
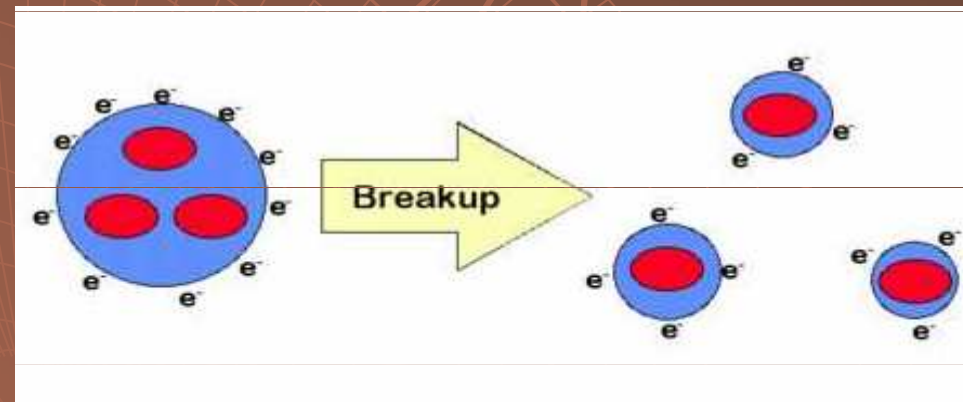
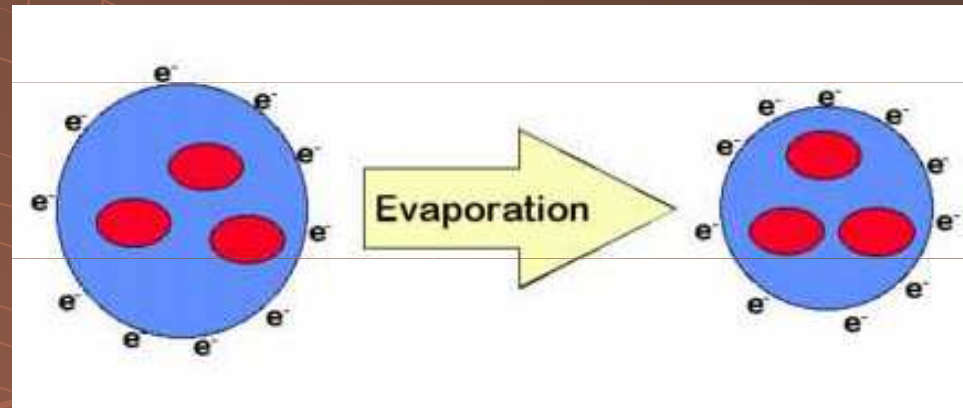
# LC-MS



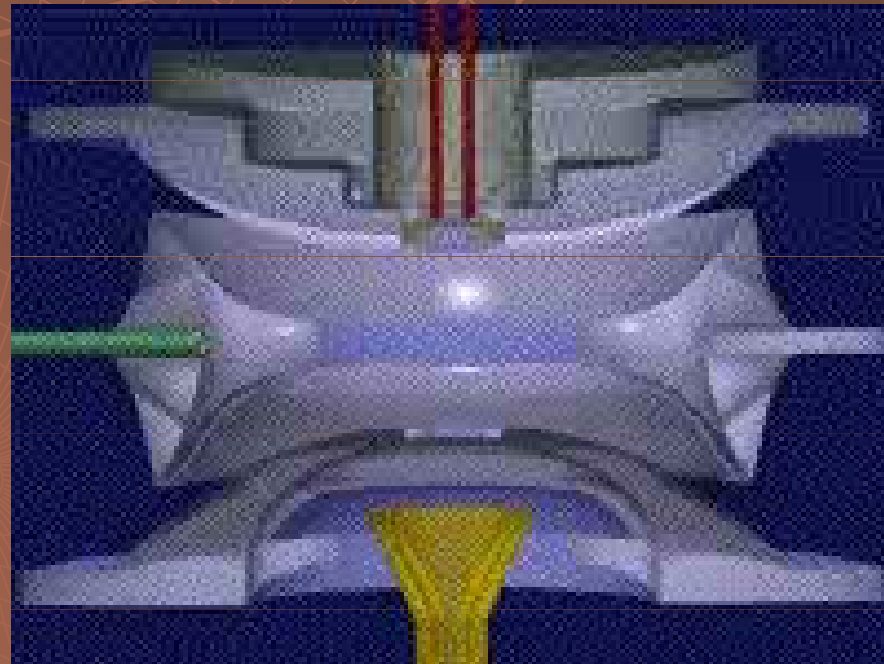
# „Electrospray“



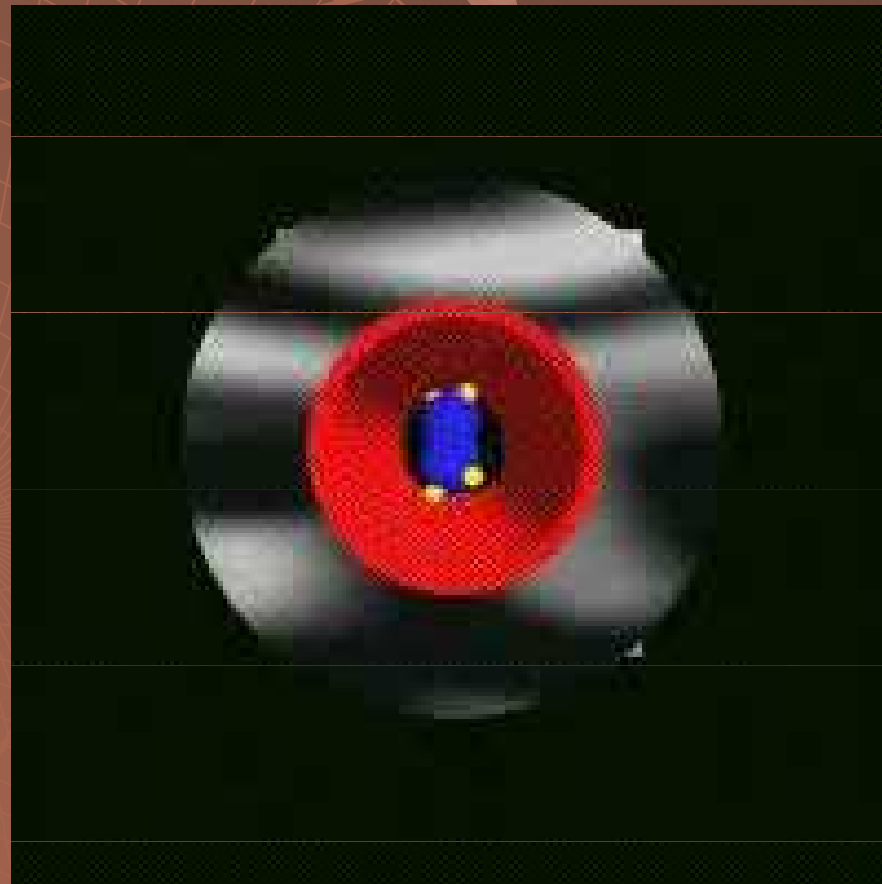
# Ionizace



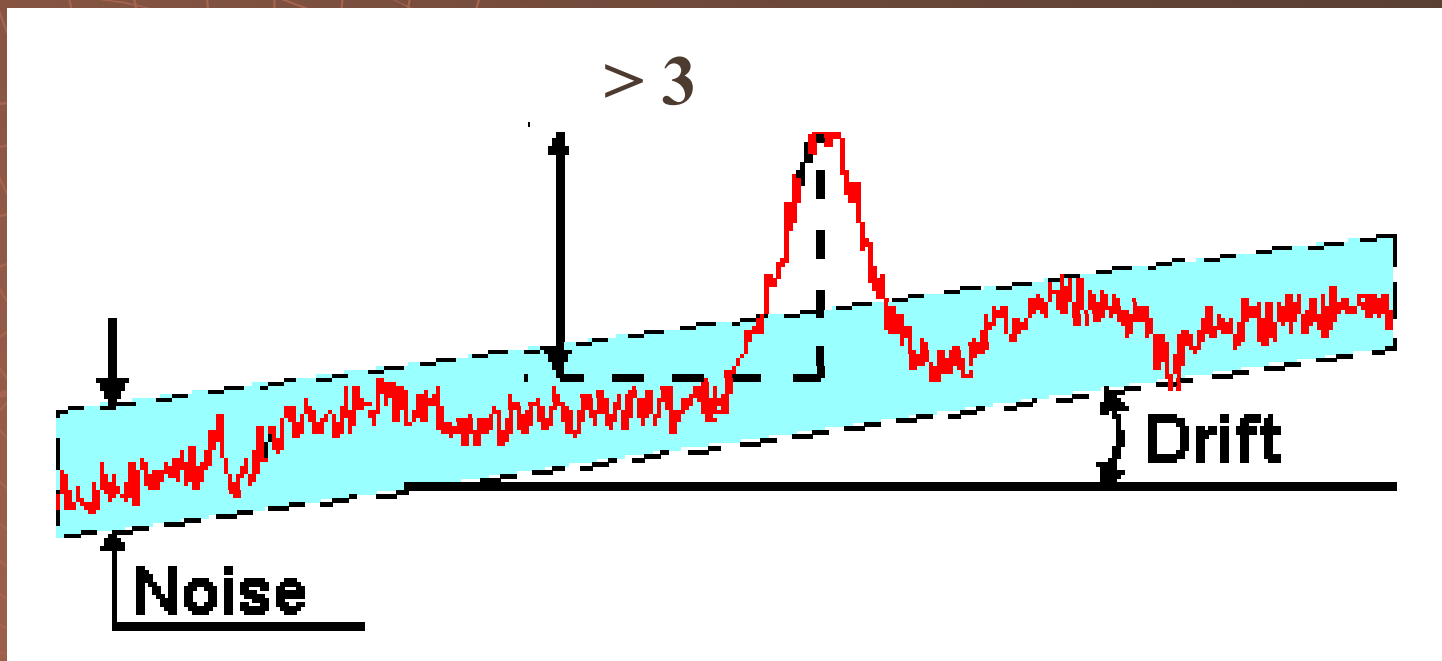
# Ion Trap



# Kvadrupol



# Šum a drift detektoru

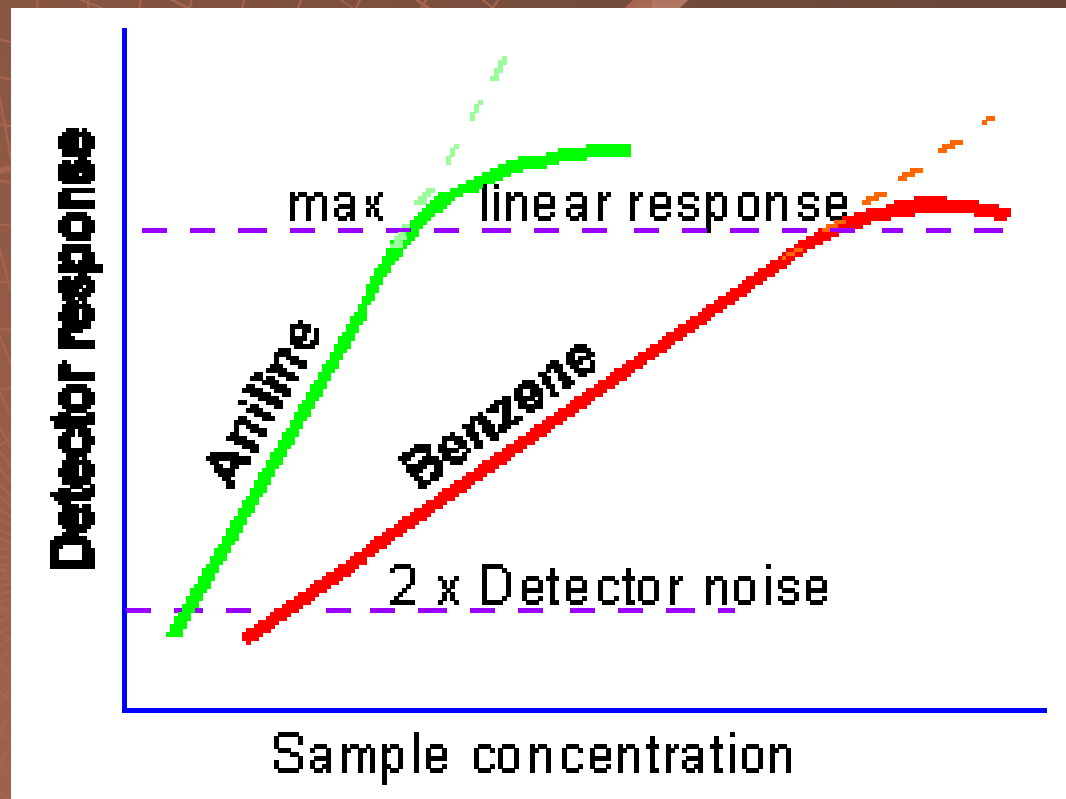


Mez detekce  $S/N > 3$

Mez stanovitelnosti  $S/N > 10$



# Lineární rozsah detektoru



# Derivatizace

- ◆ zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec
- ◆ zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec
- ◆ zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně

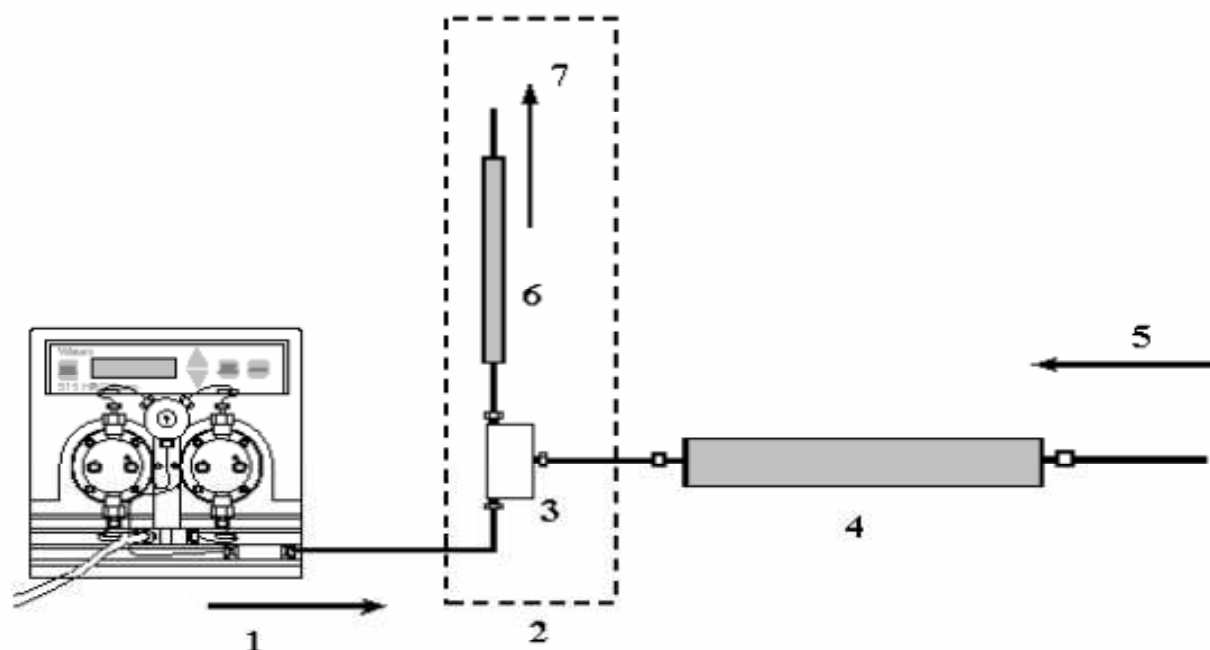
# Požadavky na deriváty

- ◆ chemické individuum
- ◆ stabilní
- ◆ reakce kvantitativní, rychlá, selektivní bez vedlejších produktů za mírných reakčních podmínek (pH, teplota)
- ◆ činidlo musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně jiné fyzikálně-chemické vlastnosti

# Derivatizace

- ◆ „pre-column“ - před vlastní analýzou
- ◆ „post-column“ – za kolonou po analýze

# Derivatizace



- 1 - derivatizační pumpa derivatizačního reagentu
- 2 - postkolonový systém
- 3 - směšovací komůrka (mixér)
- 4 - chromatografická kolona
- 5 - směr toku mobilní fáze
- 6 - derivatizační reaktor (smyčka)
- 7 - směr toku činidla (efluentu) k detektoru

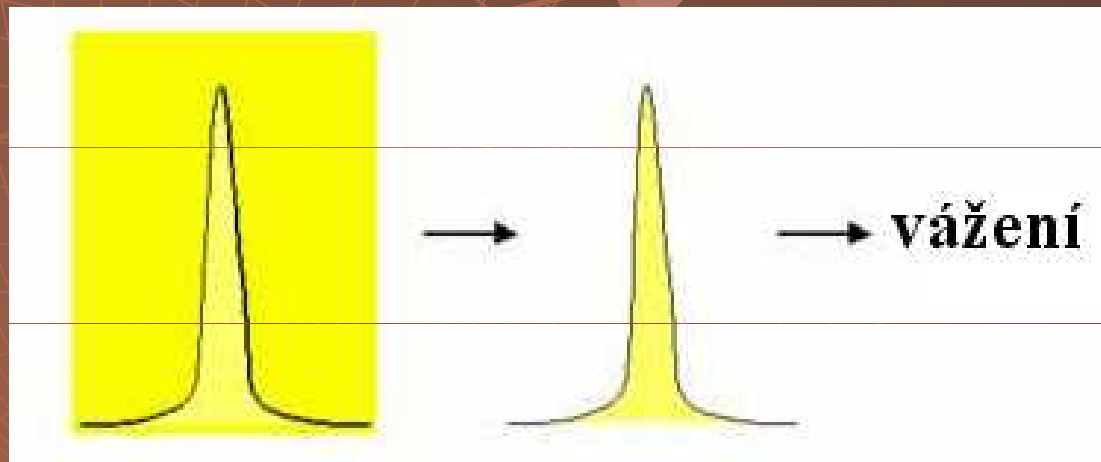
**Jednostupňová postkoloná derivatizace**

# Vyhodnocení

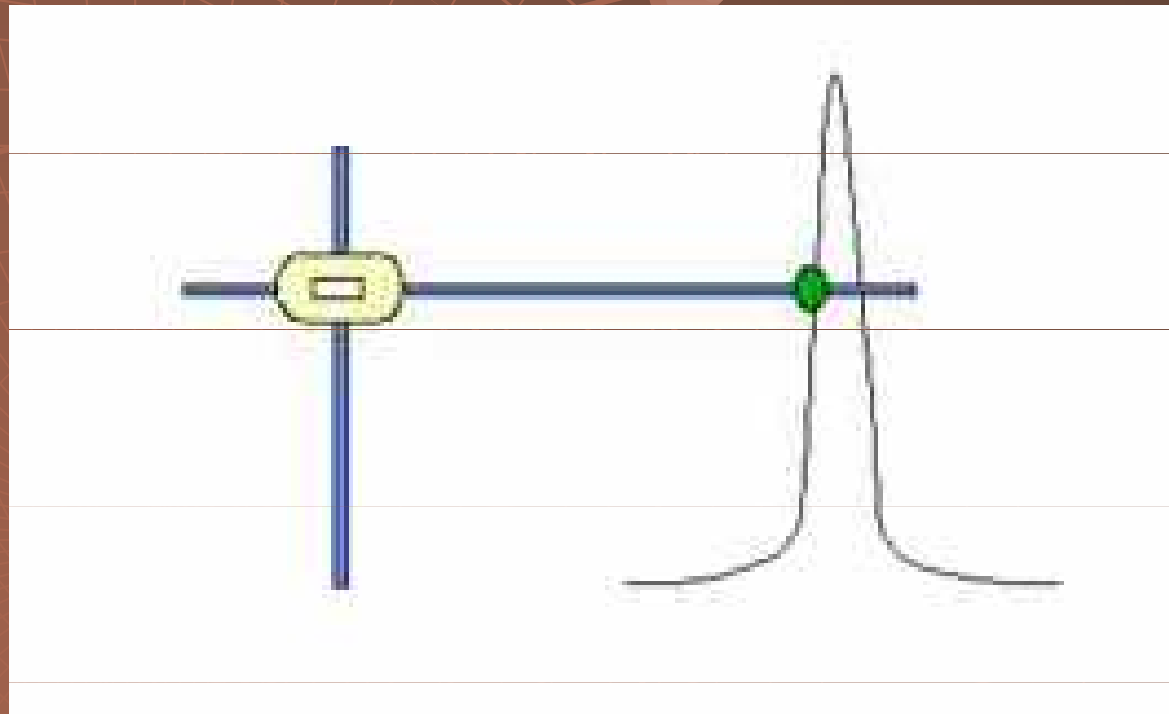
- ◆ Zapisovače
- ◆ Integratory
- ◆ Integrační software + PC



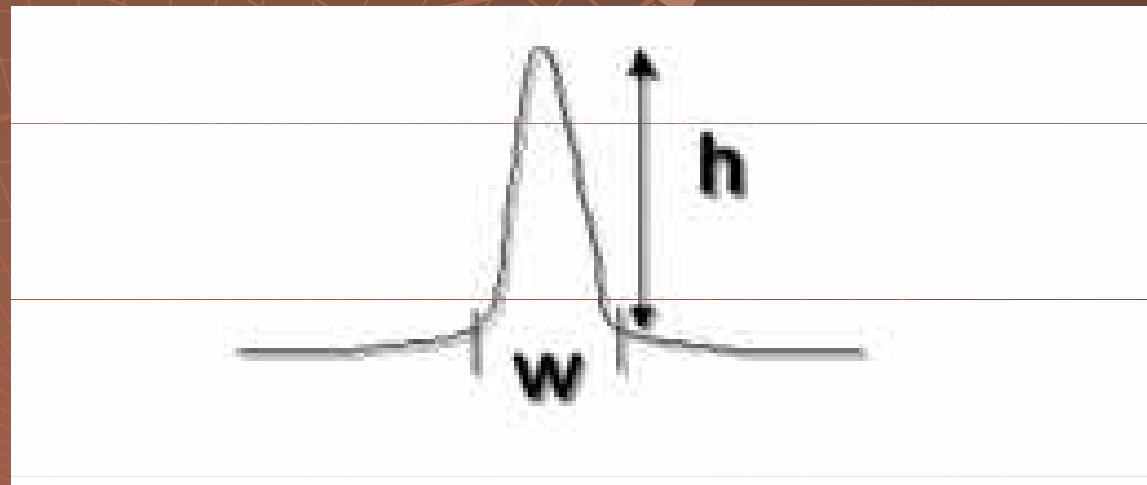
# Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením



# Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

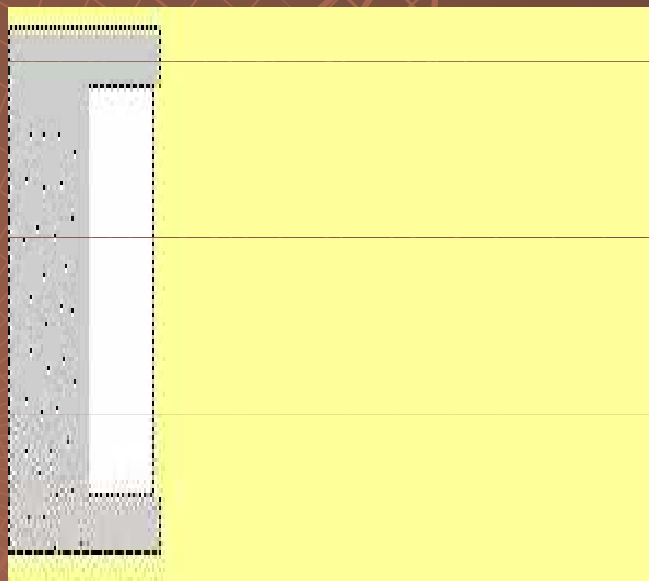


# Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



plocha = základna x výška/2

# Integrator



# Provedení

- ◆ Analytické
- ◆ Preparativní

# Analýza kvalitativní



Retenční (eluční) čas

X

Retenční (eluční) objem



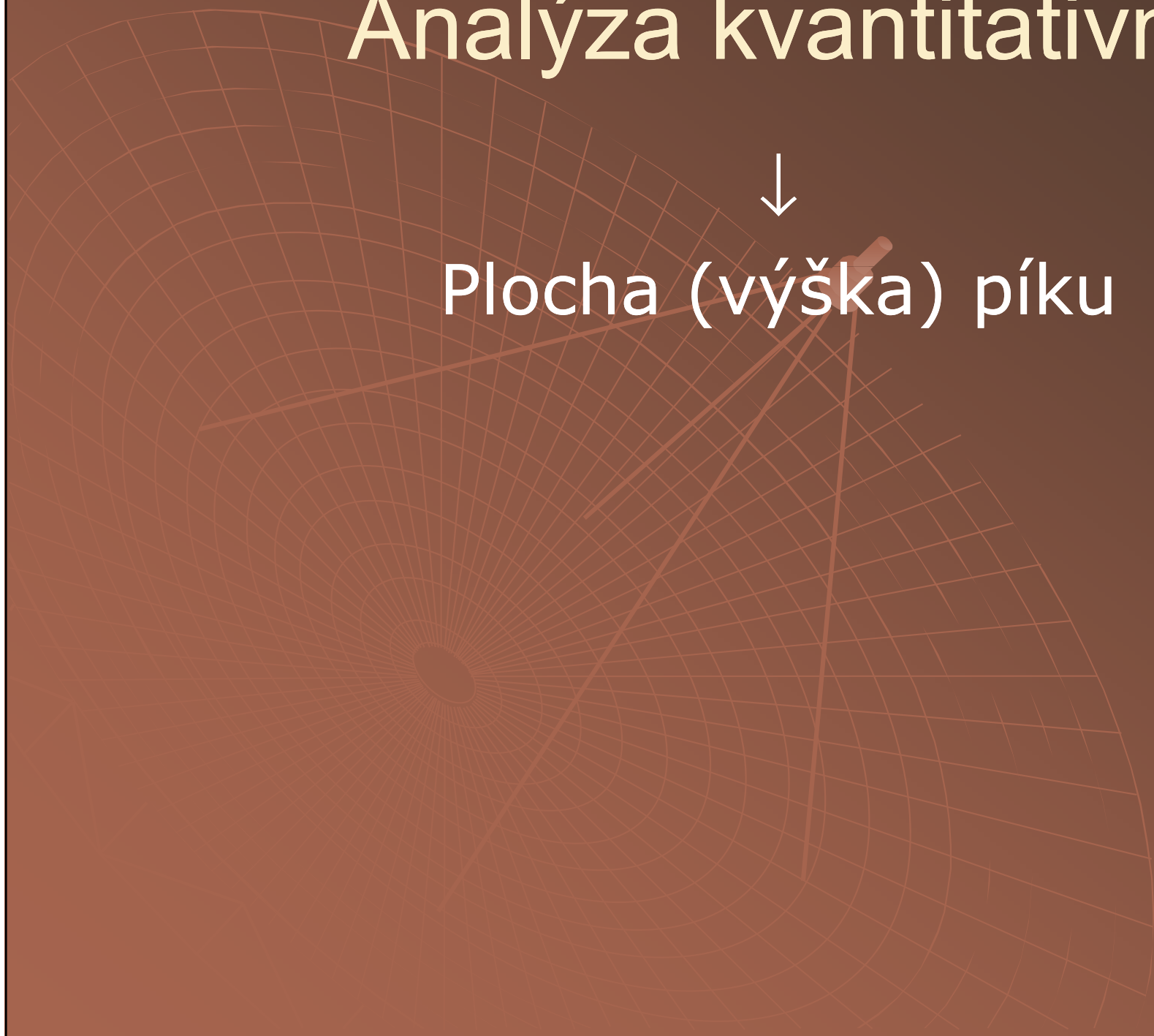
# Analýza kvalitativní

- ◆ Srovnání retenčních časů (objemů) píků u vzorku a standardů
- ◆ „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- ◆ Specifická detekce – UV-VIS, fluorescence, elektrochemická
- ◆ MS

# Analýza kvantitativní

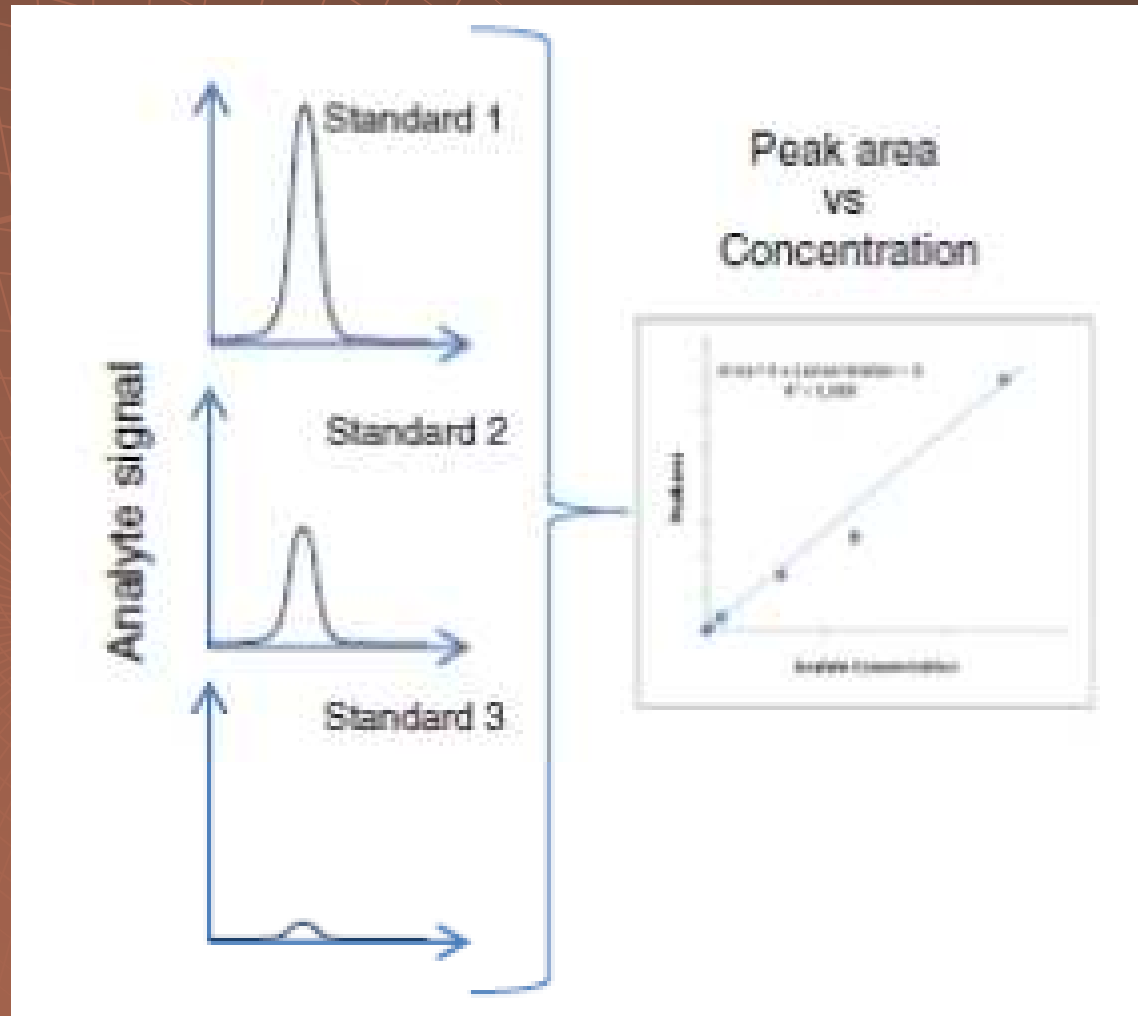


Plocha (výška) píku



# Metoda externího standardu

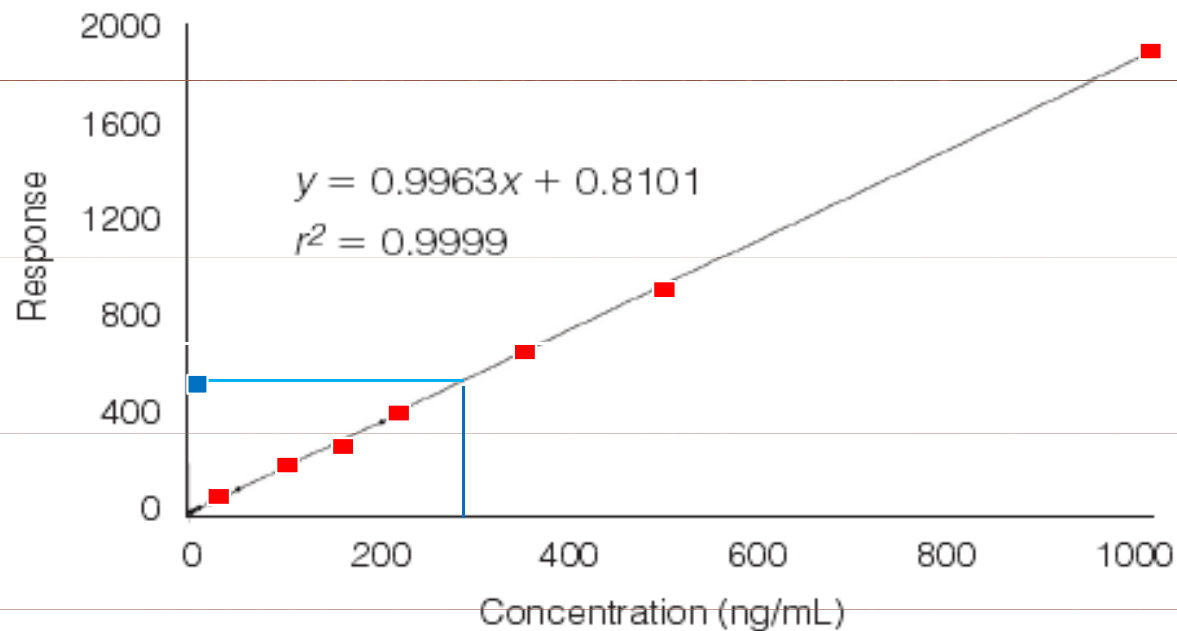
- ◆ Metoda externího standardu



# Analýza kvantitativní

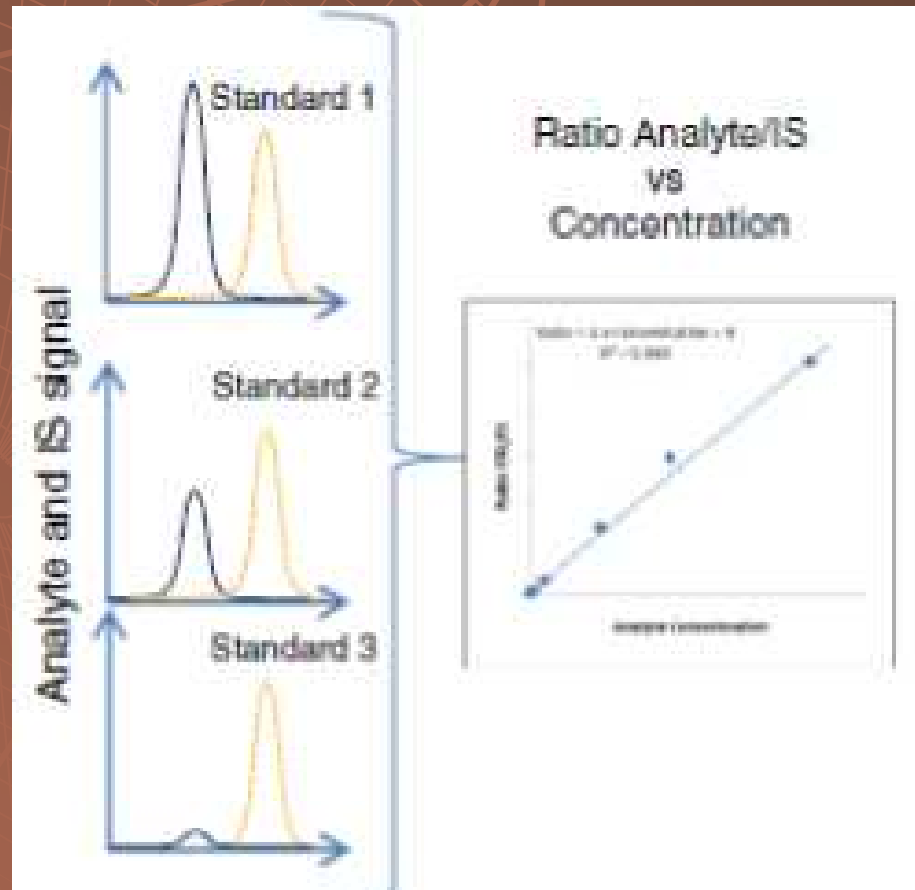
## ◆ Metoda externího standardu

Figure 1: Calibration plot of response versus concentration.



# Analýza kvantitativní

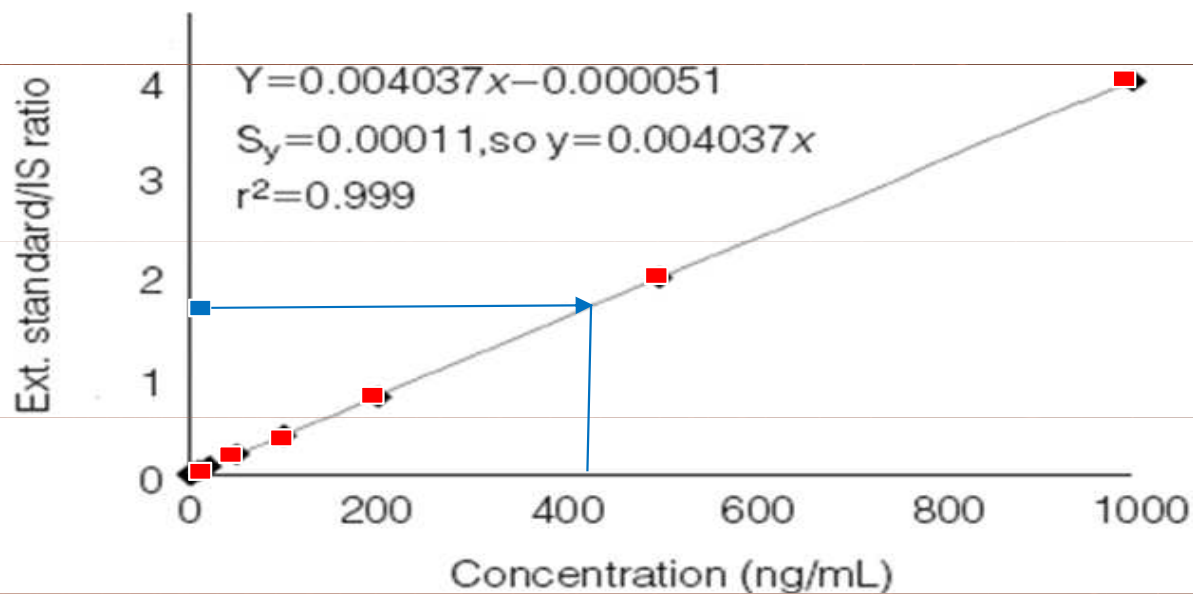
- ◆ Metoda vnitřního standardu



# Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda vnitřního standardu

Figure 2: Internal standard calibration plot from data in Table 1.

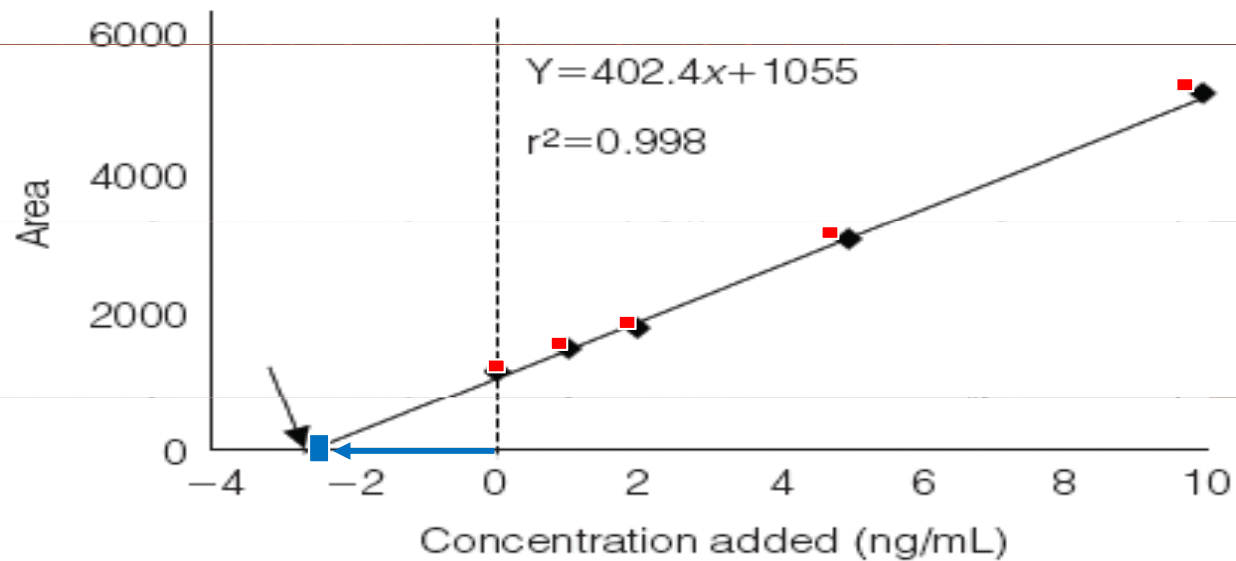




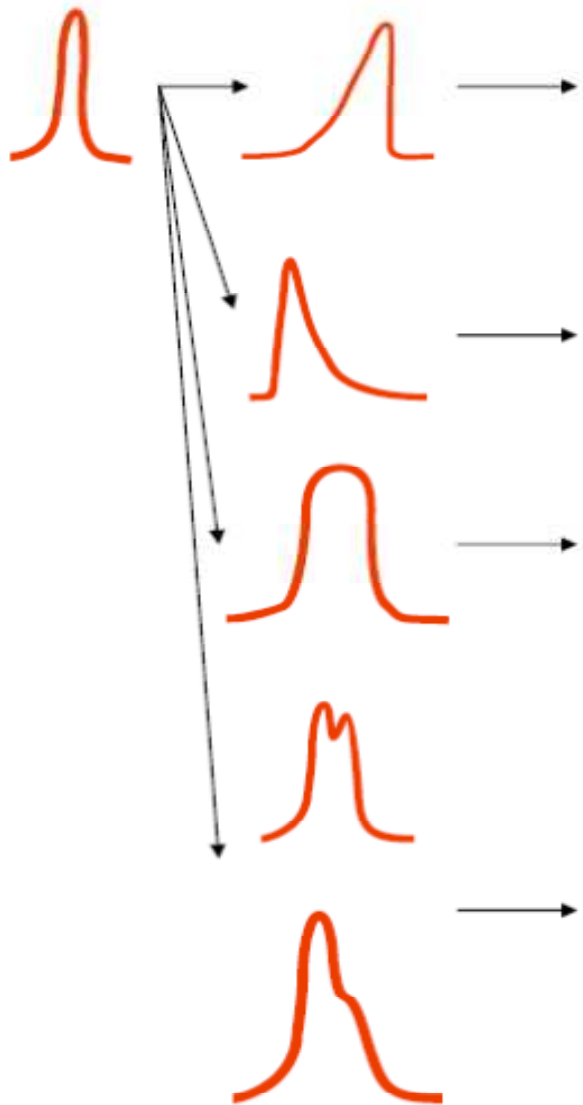
# Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda standardního přídatku

Figure 3: Standard additions calibration plot from data in Table 1.



# Problémy při LC analýze



•vzorek je rozpuštěn v prostředí o vyšší iontové síle než mobilní fáze

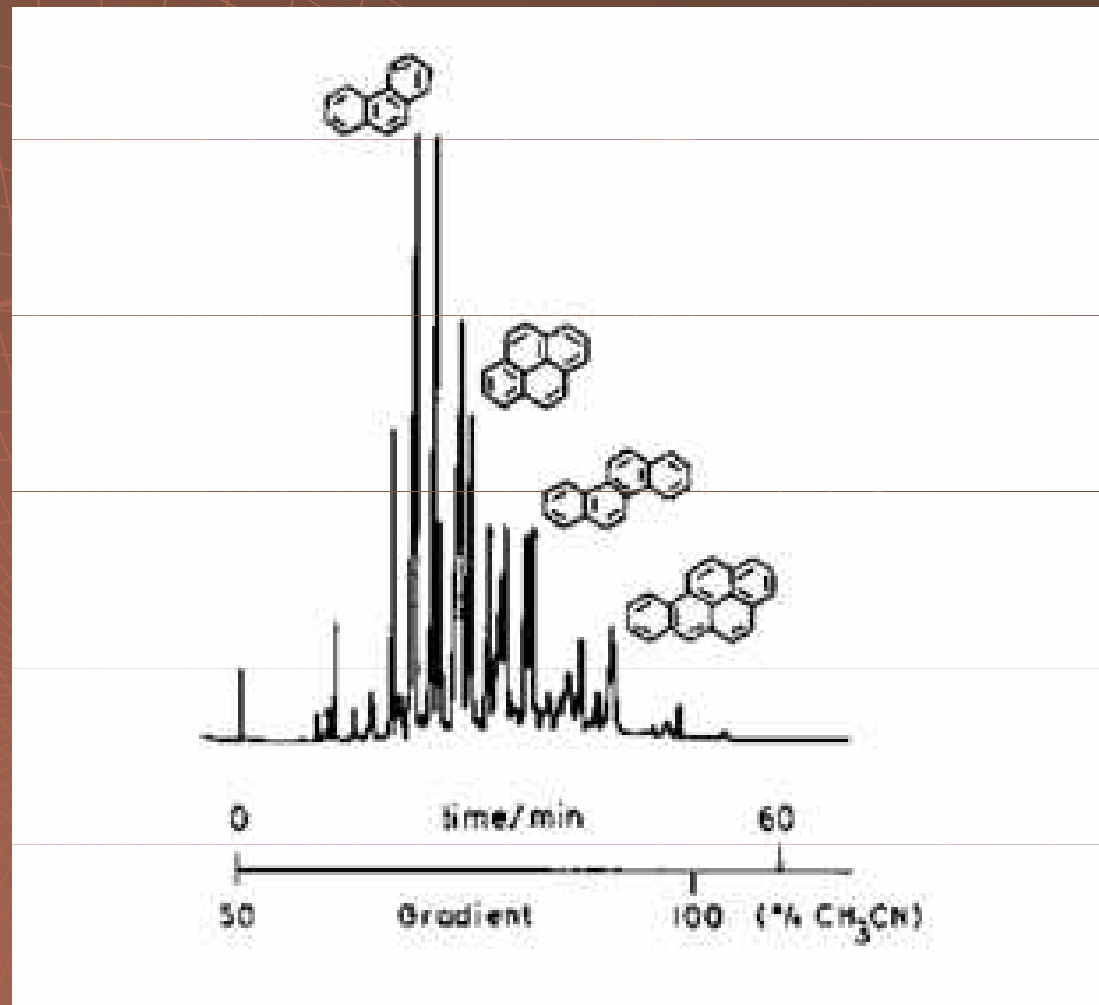
- špatná rozpustnost v mobilní fázi
- kanálky ve stacionární fázi

- sedlá náplň kolony
- nespecifické interakce
- silná retence vzorku
- přetížení kolony

- snížit nástřik
- poškozená kolona
- nečistoty v koloně

- nerozdělené píky
- kanálky v koloně
- nečistoty na koloně
- nástřik ve dvou podílech

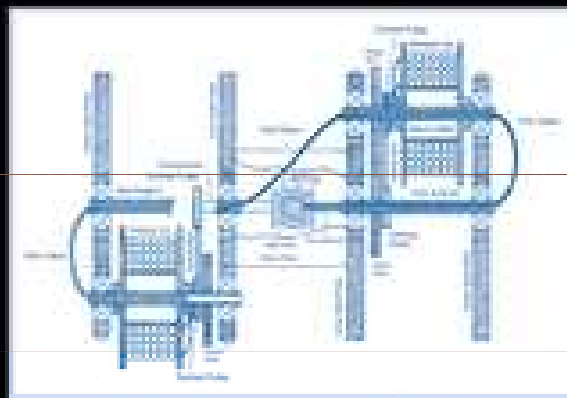
# LC analýza



# Countercurrent Chromatography

CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES VOLUME 62

## Countercurrent Chromatography



edited by  
Jean-Michel Menet  
Didier Thiébaud

# Countercurrent Chromatography

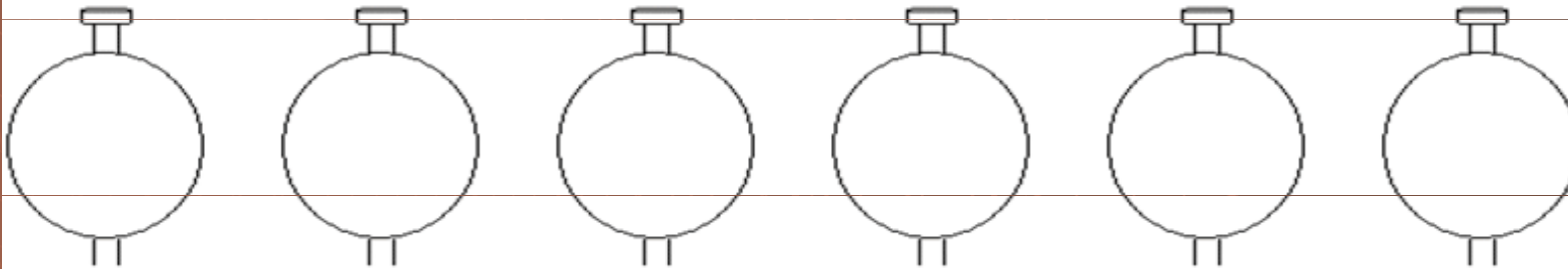
- ◆ Mobilní fáze - kapalina
- ◆ Stacionární fáze - kapalina

# Výhody

- ◆ Vysoká kapacita
- ◆ Jednoduchý retenční mechanismus
- ◆ Žádné ireverzibilní sorpce
- ◆ Minimální denaturace



# Princip CCC



$$K_D = \frac{[A]_{\text{stat}}}{[A]_{\text{mob}}}$$

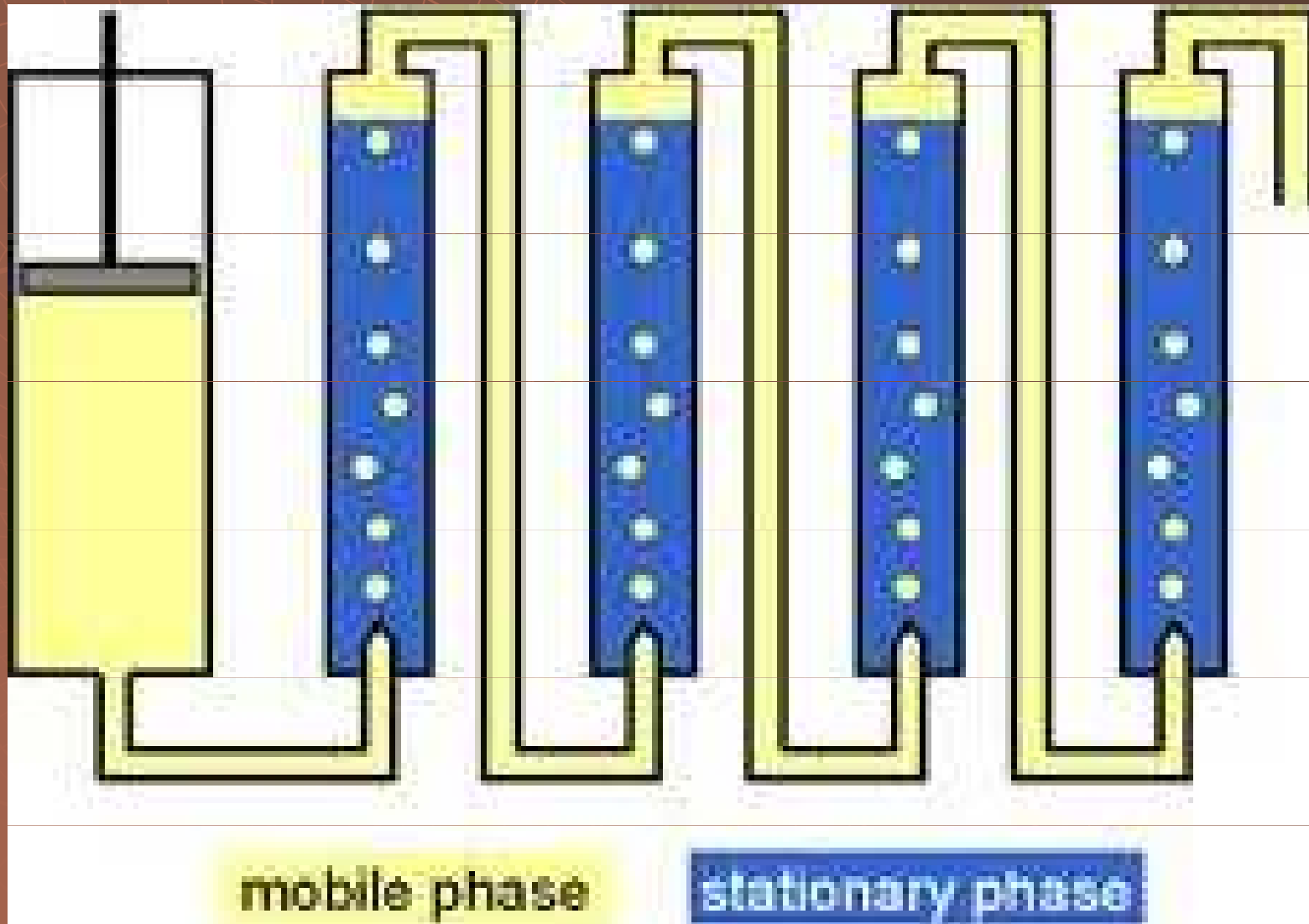
■  $K_D > 1$

●  $K_D = 1$

▲  $K_D < 1$

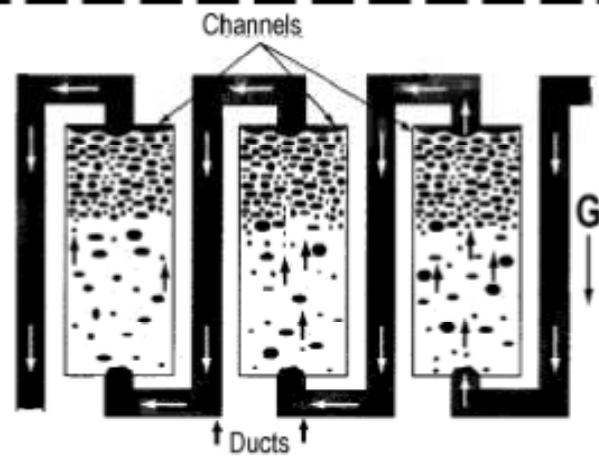
# Countercurrent Chromatography „kapičková“ CCC

89



Rotor axis

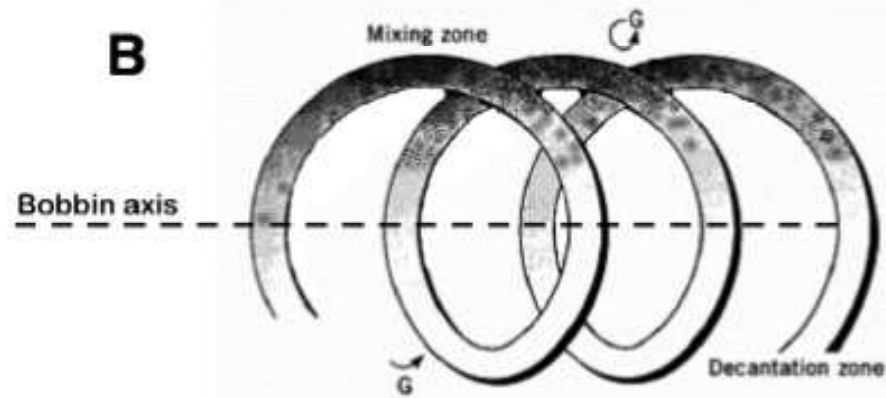
**A**



**Hydrostatic design**

Rotor axis

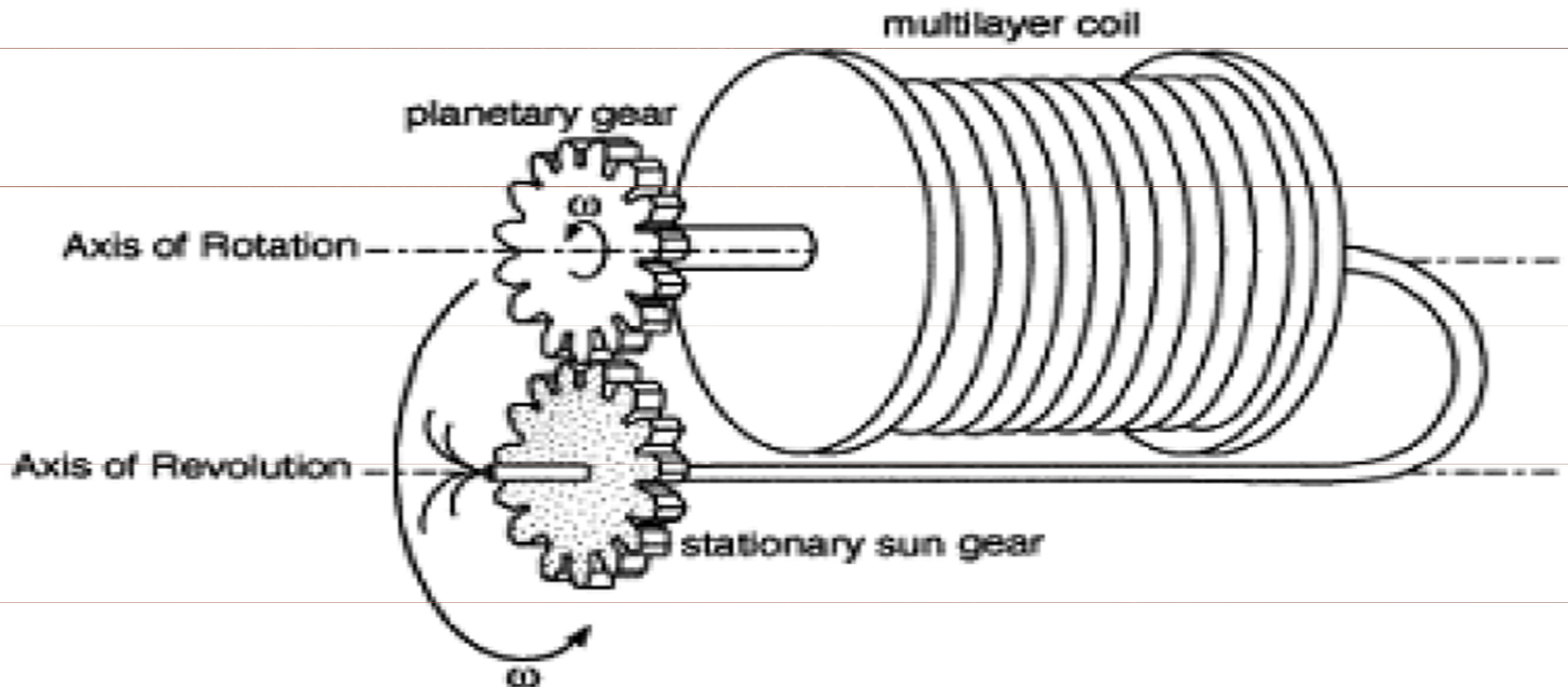
**B**



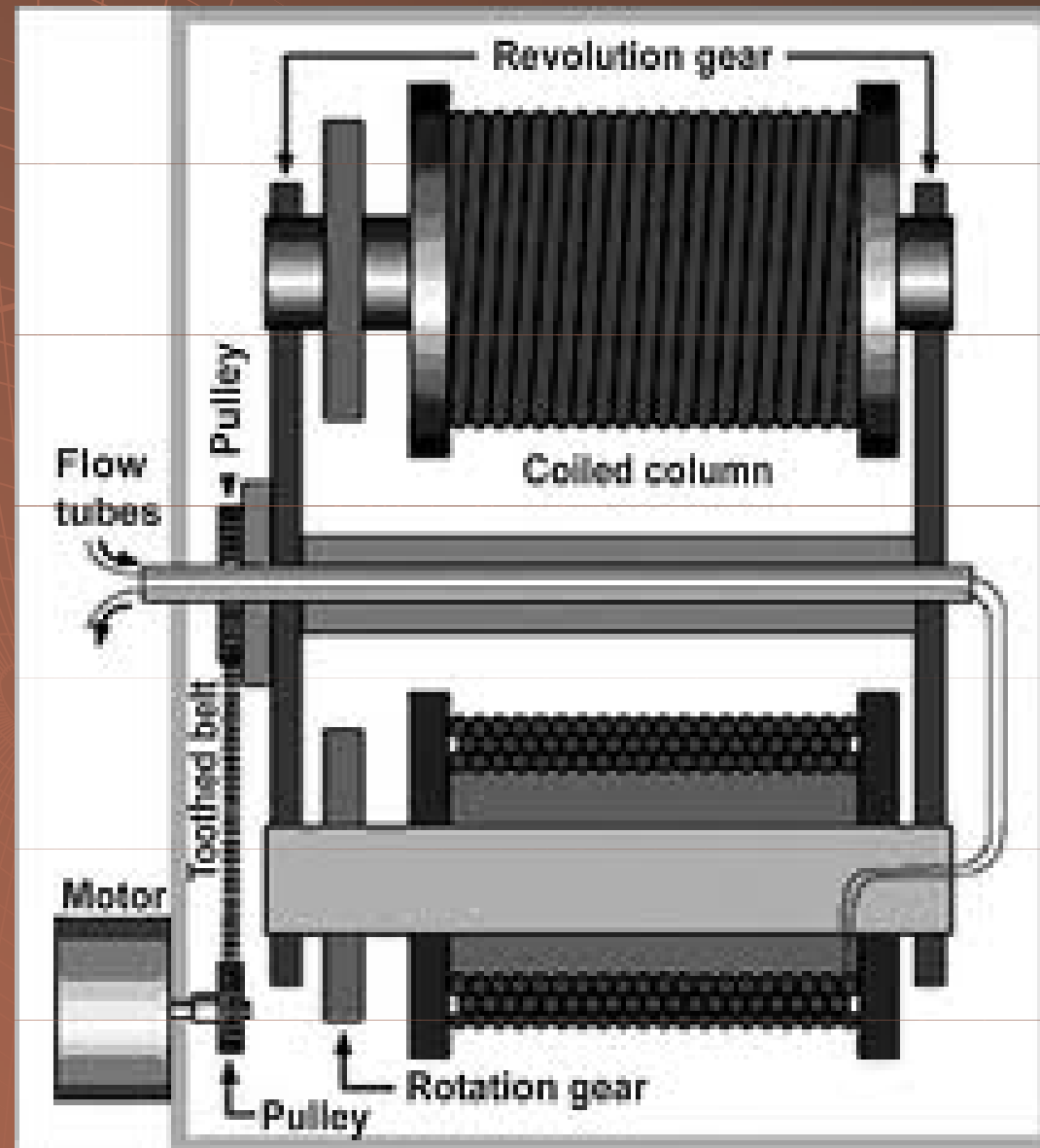
**Hydrodynamic design**

# Countercurrent Chromatography rotační CCC

## Type-J Synchronous Planetary Motion



# Countercurrent Chromatography rotační CCC

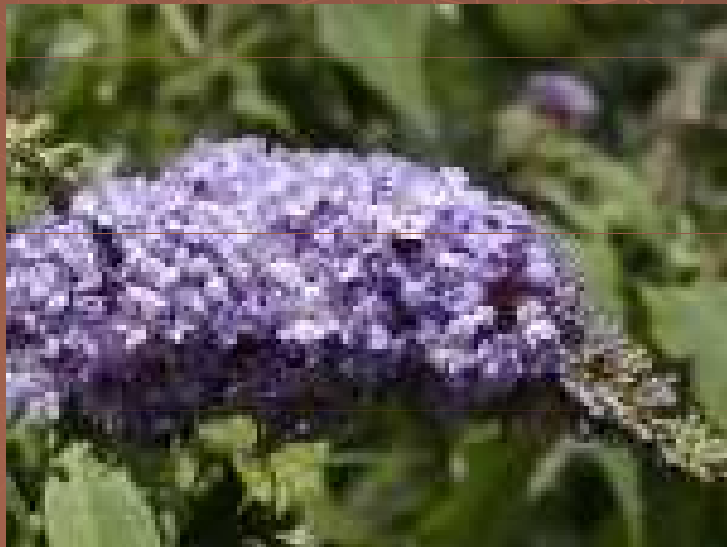


# Countercurrent Chromatography

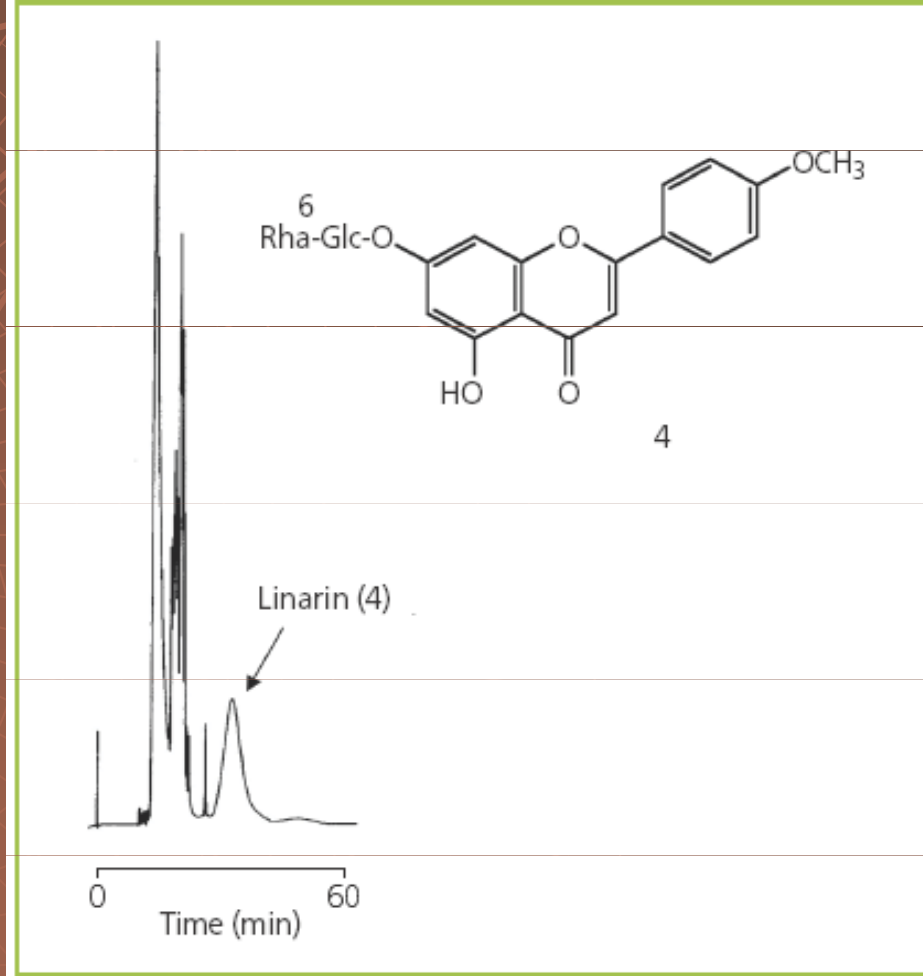




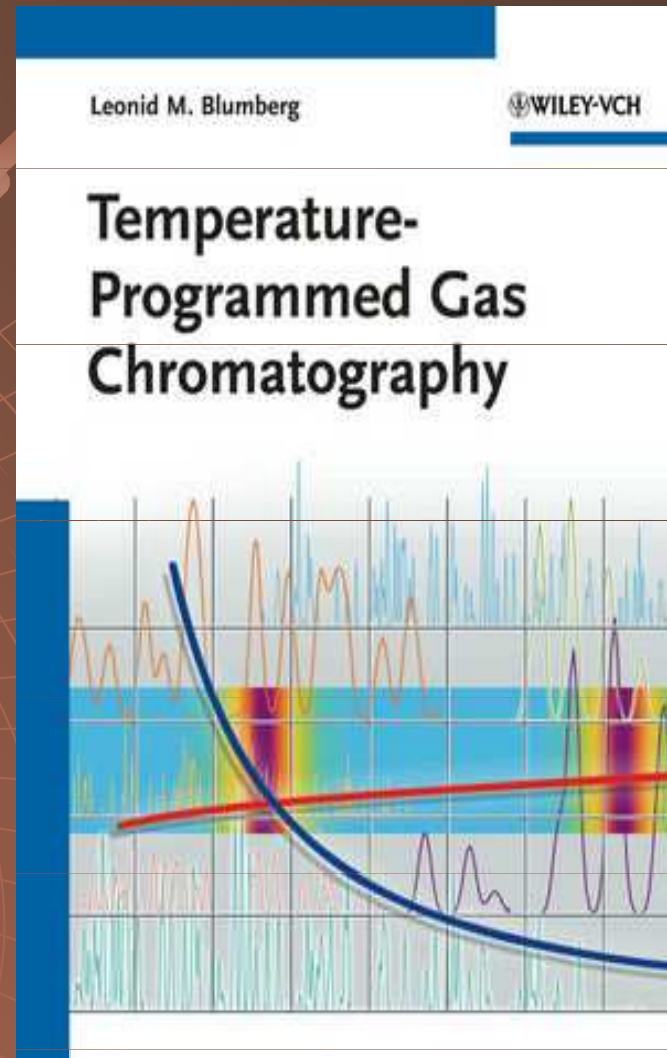
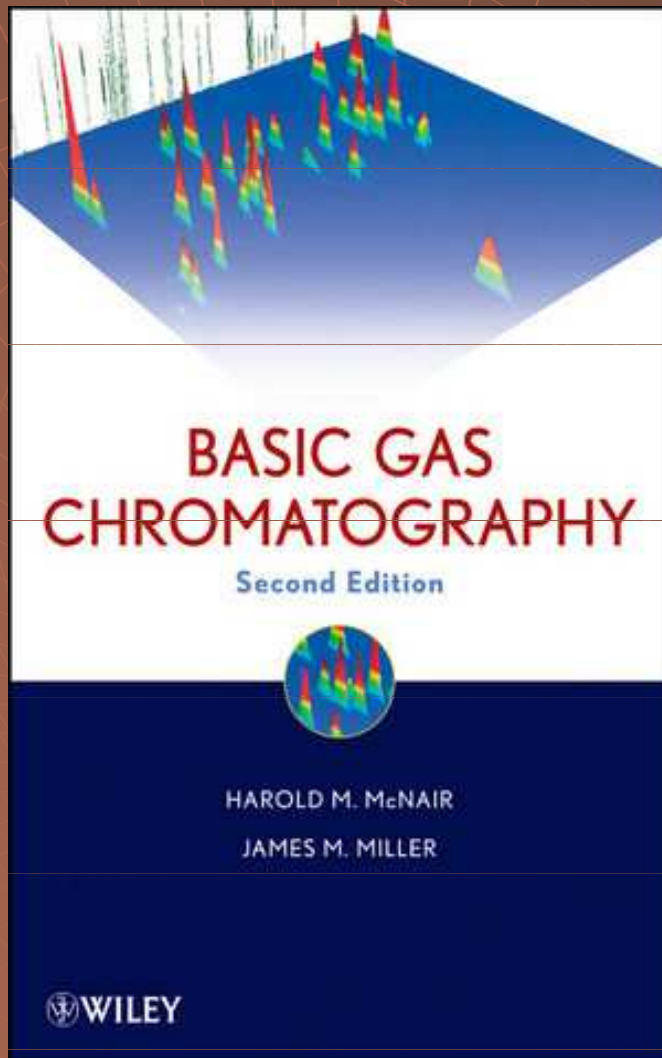
# Countercurrent Chromatography



**Figure 3:** CCC of a methanol extract of *Buddleja davidii* (Buddlejaceae) leaves on a DE instrument with 17 mL coil; rotation speed: 2000 rpm; solvent system: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 45:33:22 (mobile phase = lower phase) at a flow-rate of 1 mL/min; sample 20 mg; detection 254 nm.



# Plynová chromatografie



# Plynová chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - plyn
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze,  
kapalina

# Výhody

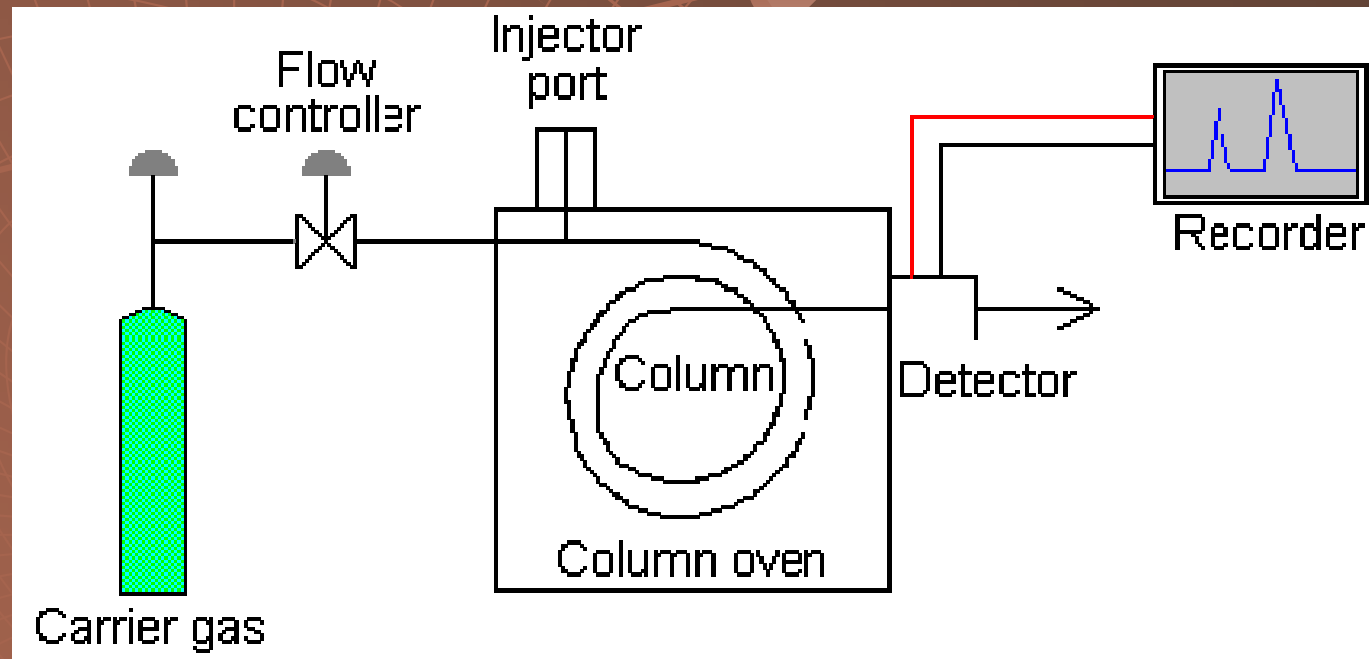
- ◆ Nižší viskozita mobilní fáze
- ◆ Rychlejší difuze

# Nevýhody

- ◆ Použitelné jen pro těkavé látky
- ◆ Látky musí být termostabilní



# Schéma plynového chromatografu

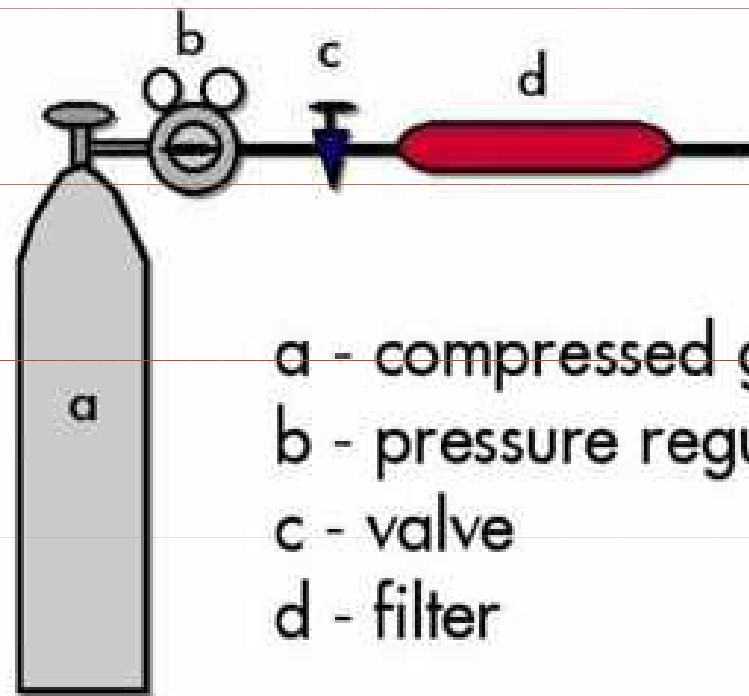




# Plynový chromatograf

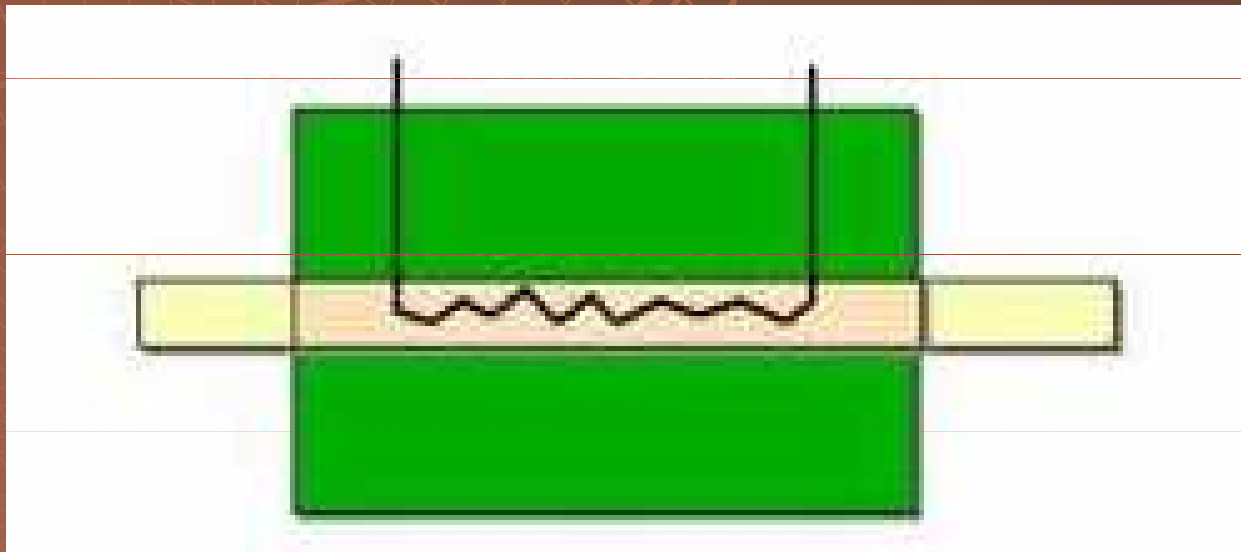


# Zdroj nosného plynu



- a - compressed gas cylinder
- b - pressure regulator
- c - valve
- d - filter

# Elektrické měření průtoku



# Nosné plyny

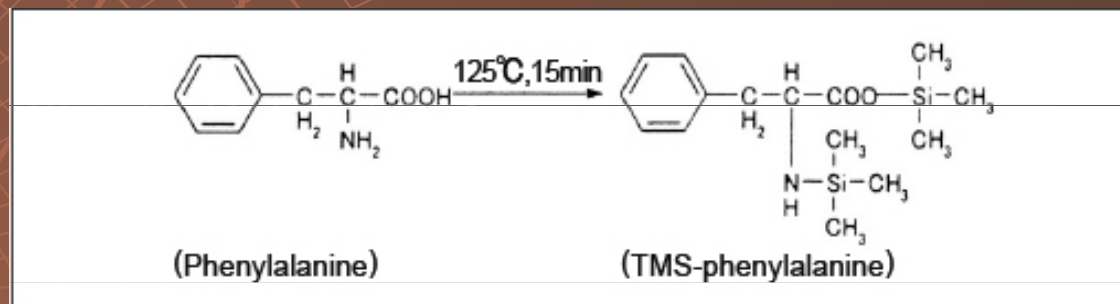
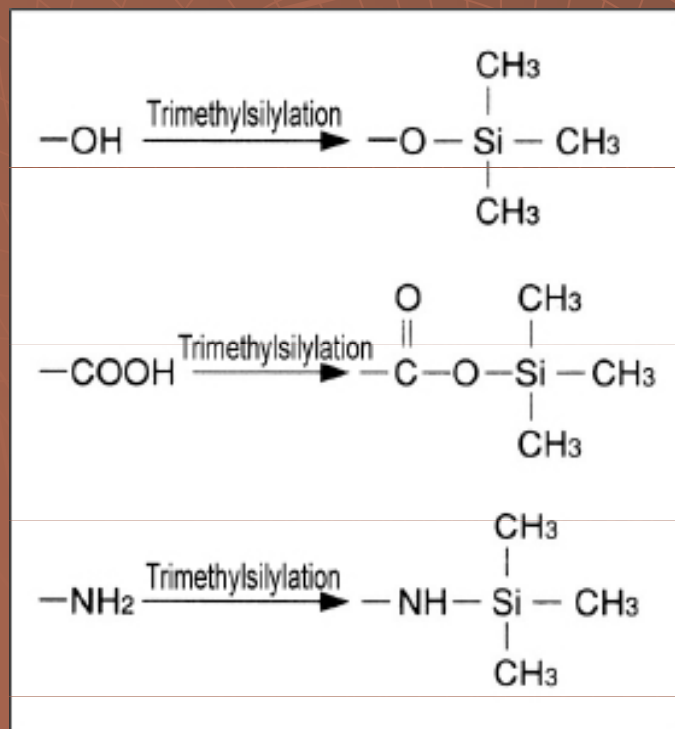
Plyn	Výhody	Nevýhody
$N_2$	levný, bezpečná práce	nízká tepelná vodivost
$H_2$	vysoká tepelná vodivost	explosivní
He	inertní	drahý
Ar	inertní	drahý

# Příprava vzorků pro GC

- ◆ Plyny, kapaliny - přímo
- ◆ Pevné látky - po derivatizaci

# Příprava vzorků pro GC derivatizace

## Silylace





# Objemy dávkovaných vzorků

◆ Plyny - 0.5 – 5 ml

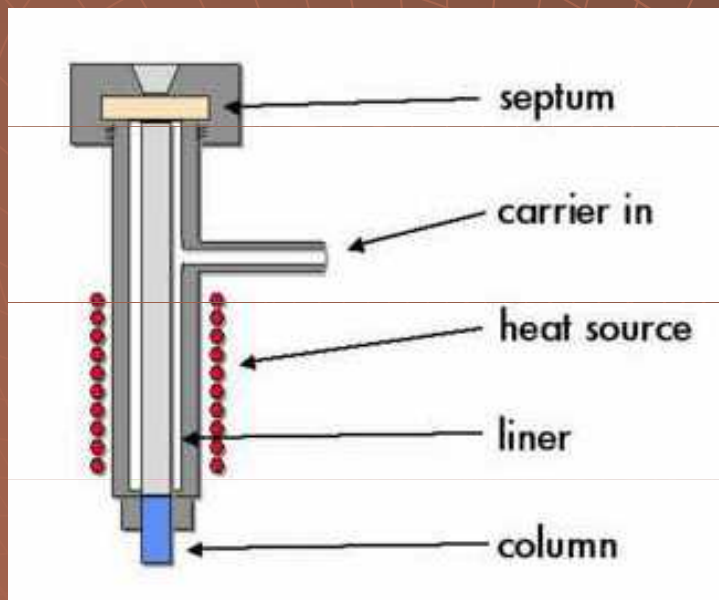
◆ Kapaliny - 0.1 – 10  $\mu$ l

# Způsoby dávkování vzorků

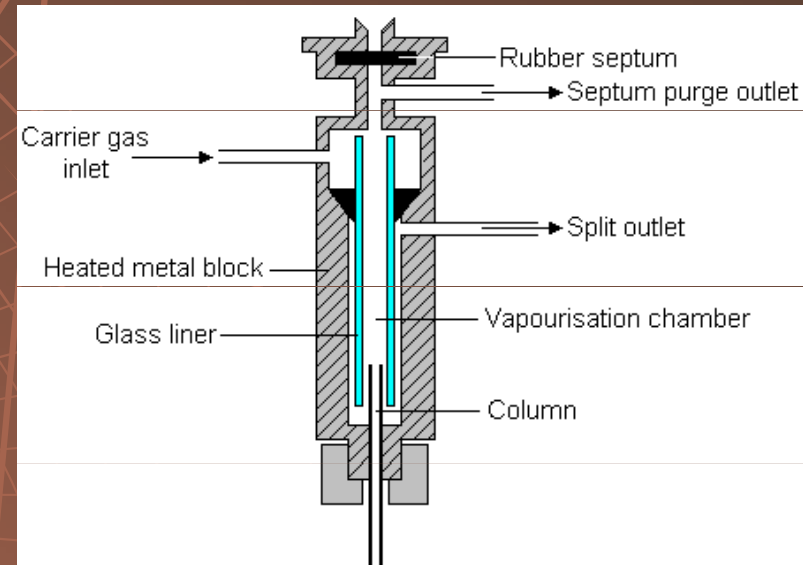
- ◆ Přes septum
- ◆ Ventilem
- ◆ Termální desorpcí

# Stříkačkou

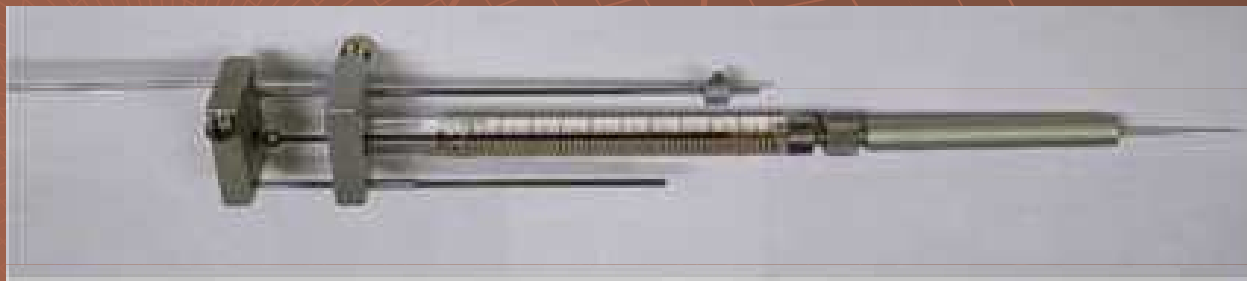
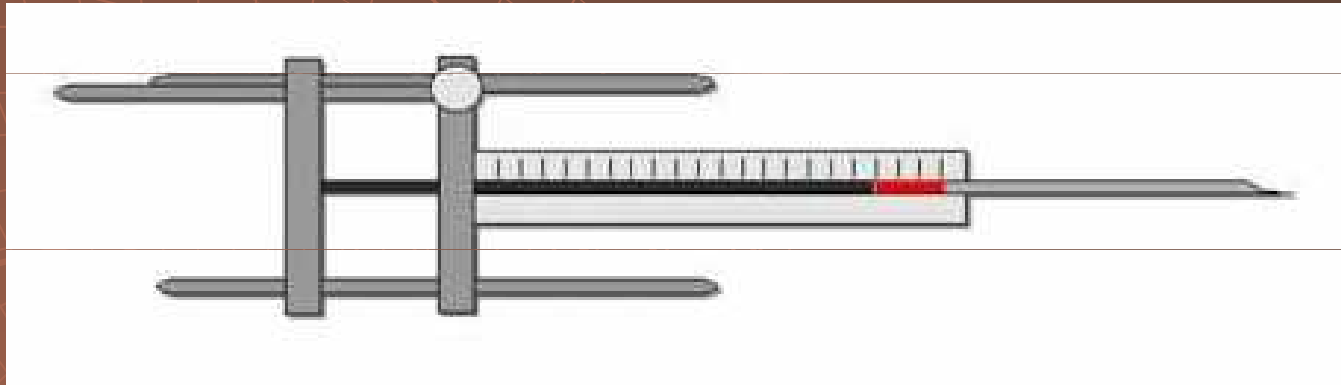
„splitless“



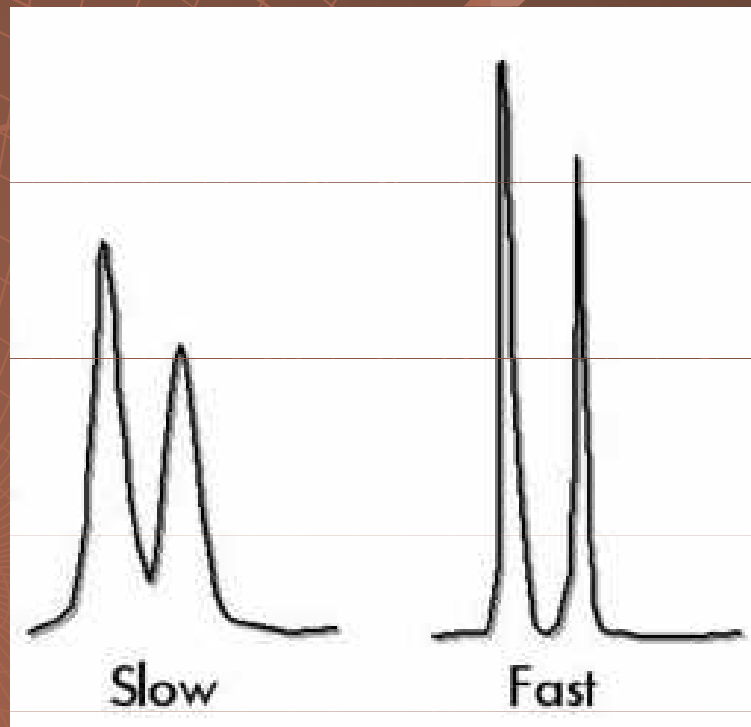
„split“



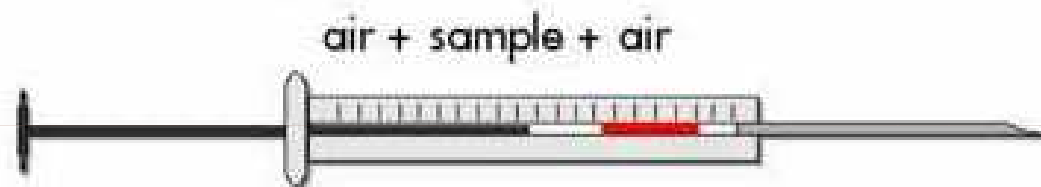
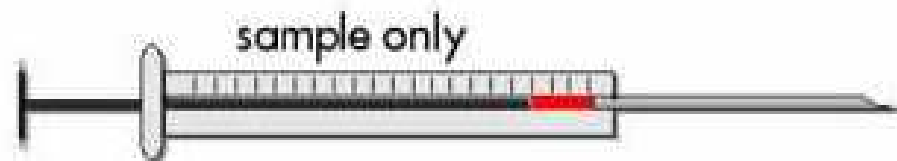
# Dávkovací stříkačka



# Rychlost dávkování



# Způsob dávkování

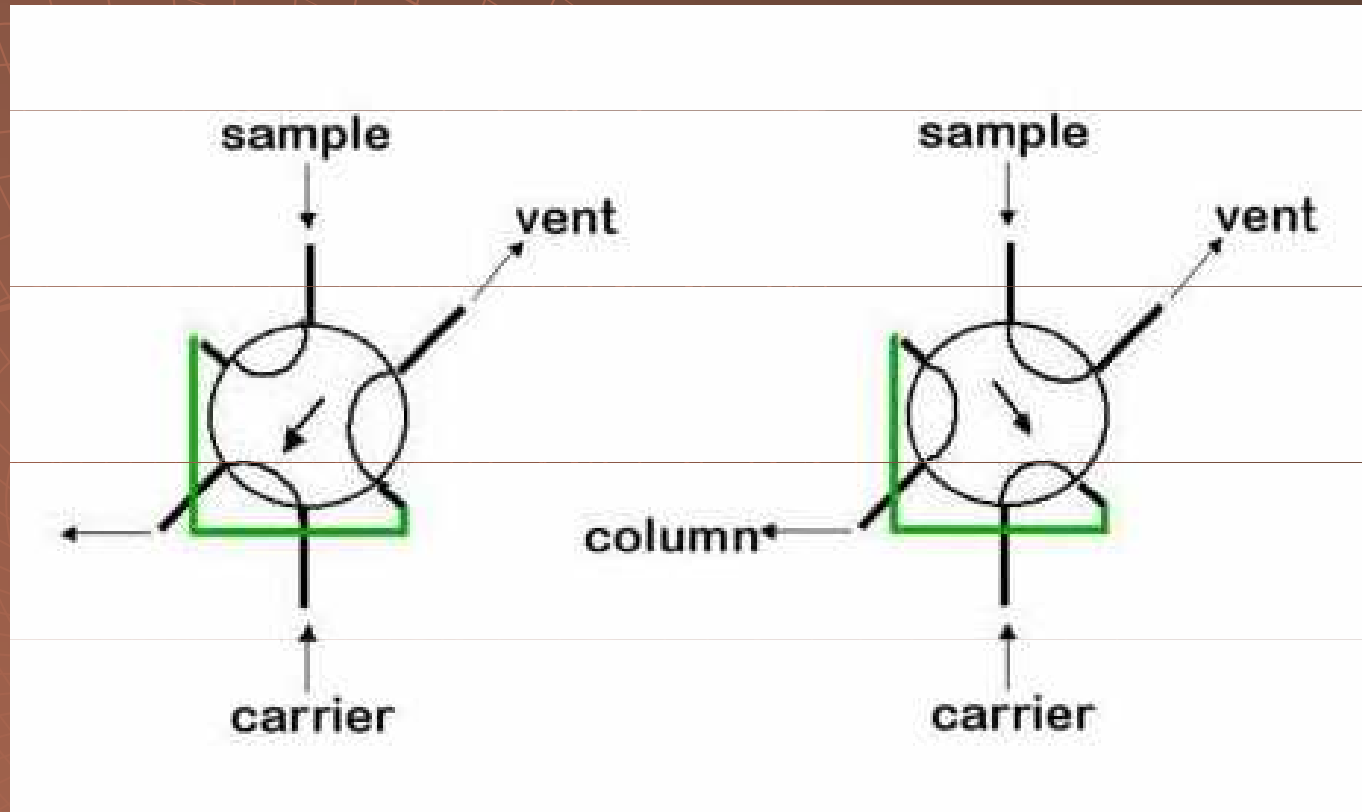




# Automatické dávkovače



# Ventilem



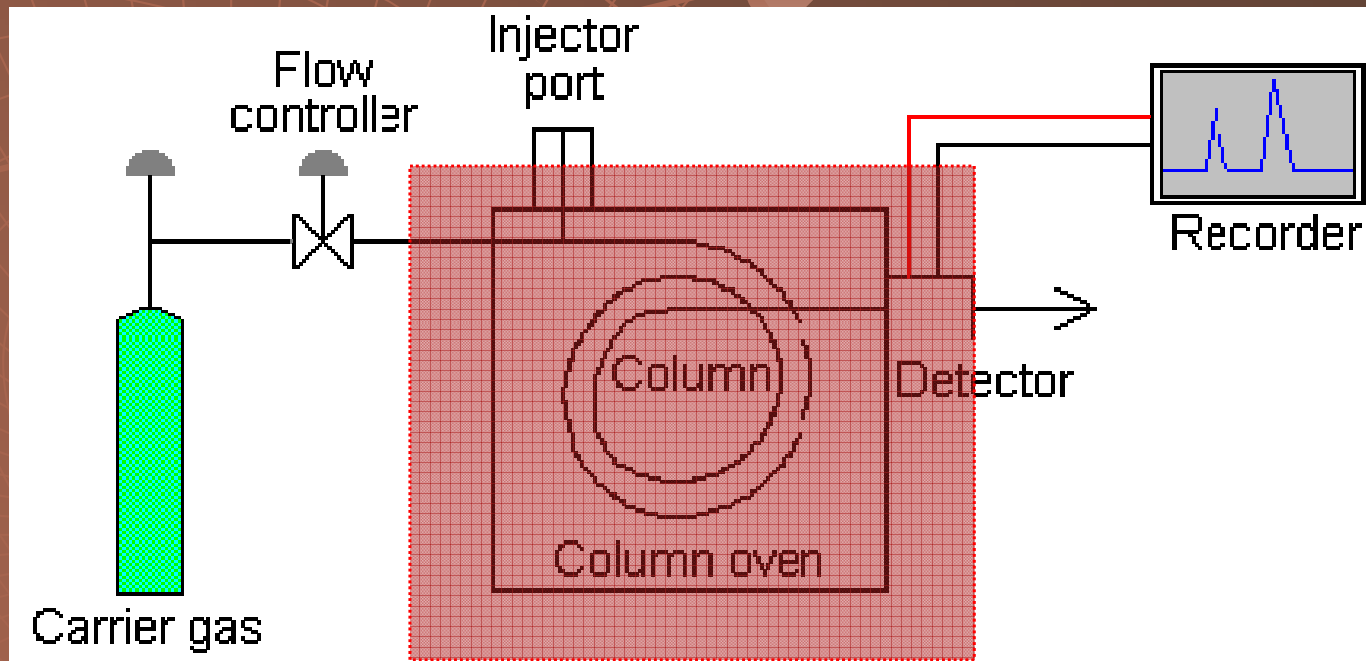
# Ventil



# Dávkování termální desorpcí



# Termosttování

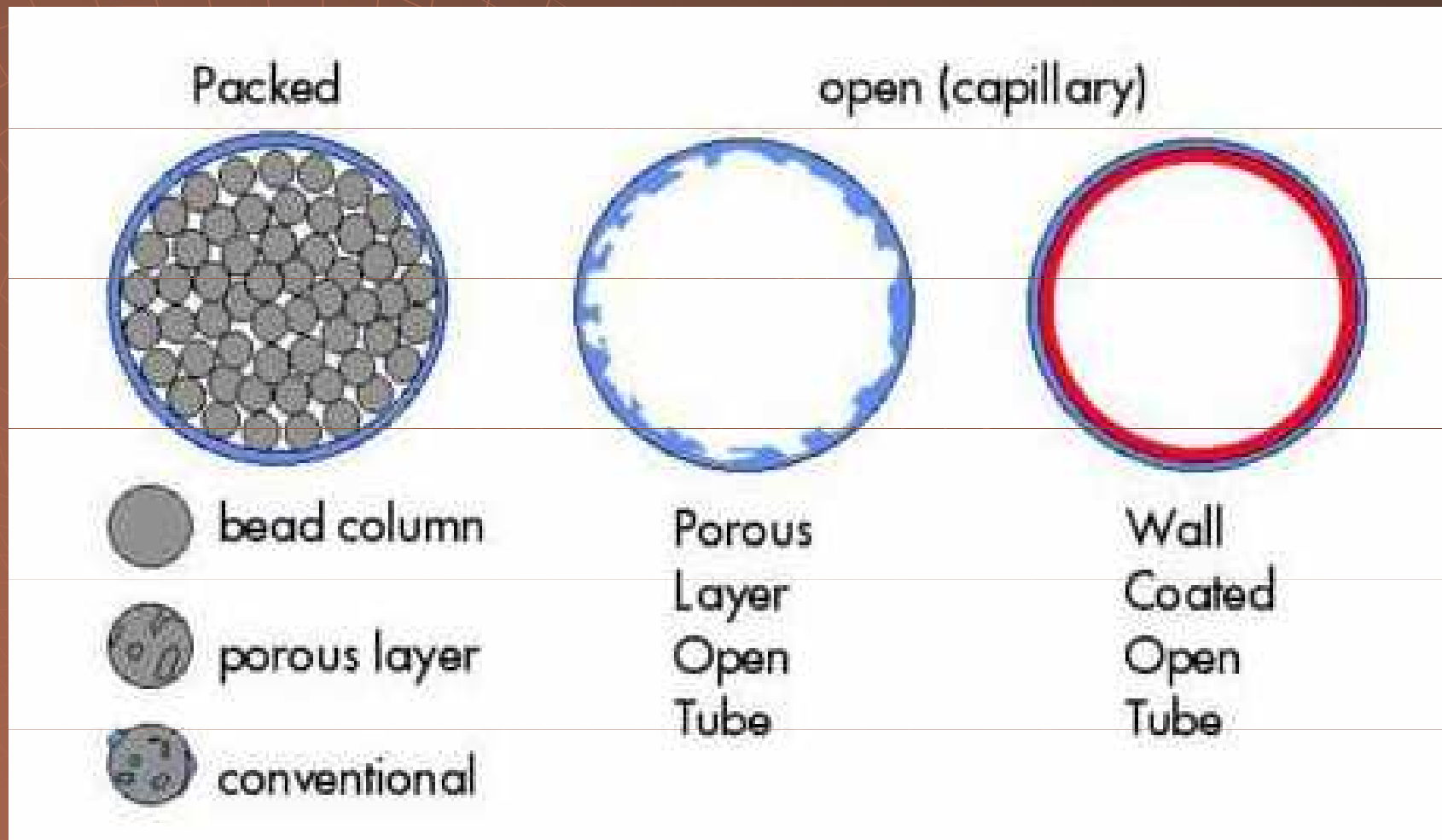


# Kolony

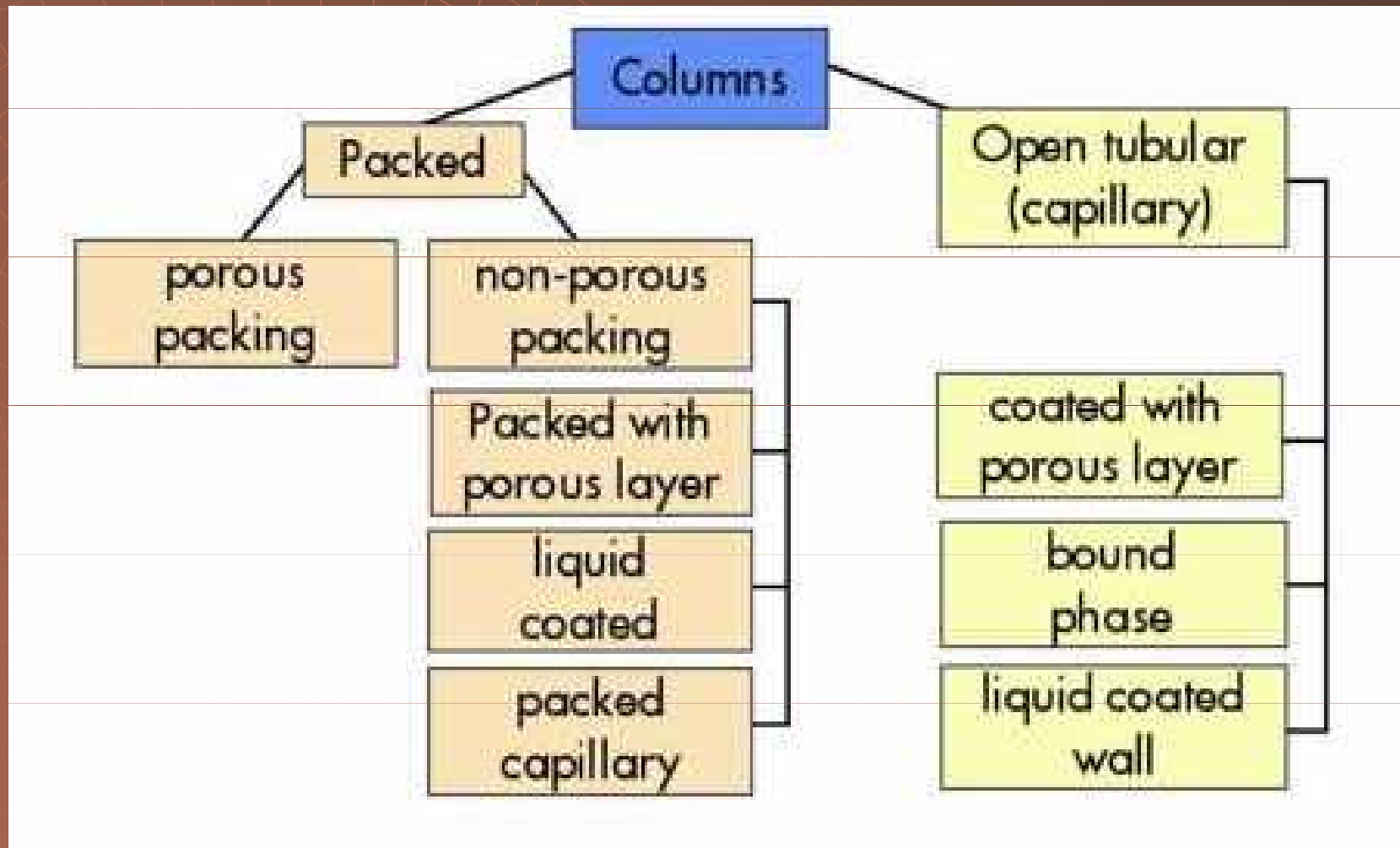
- ◆ Náplňové – ¼" OD – ocel, sklo  
délka 1m
- ◆ Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID –  
křemen, ocel, sklo  
délka – 10 - 100 metrů



# Kolony



# Kolony



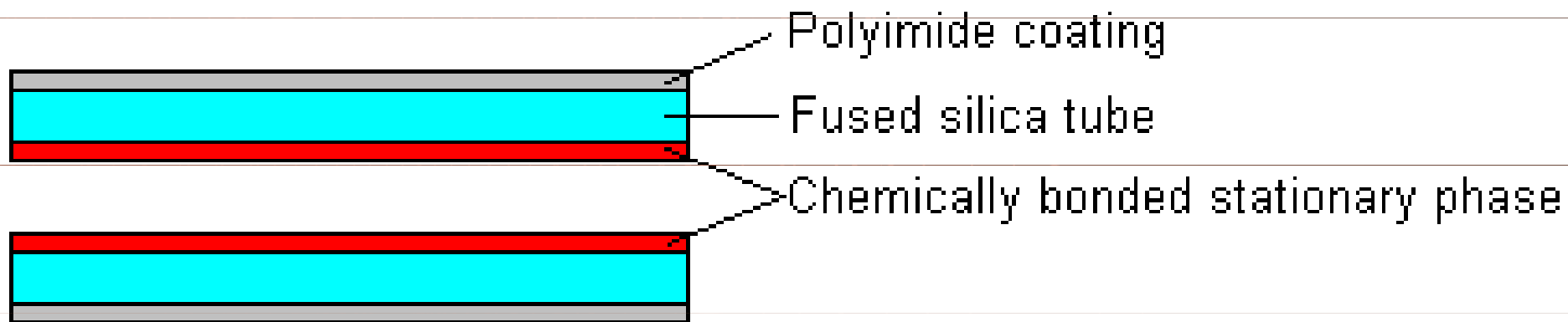
# Náplňová kolona



# Kapilární kolona



# Kapilární kolona



# Pevné stacionární fáze

Aktivní uhlí, grafitizované uhlí  
- dělení plynů a lehkých uhlovodíků

Silikagel

- dělení anorganických plynů a nízkovroucích kapalin

Molekulová síta (krystalické hlinitokřemičitany)

- dělení plynů a lehčích uhlovodíků

Porézní polymery (vinylbenzenové kopolymery)

- dělení nízkomolekulárních uhlovodíků, anorganických plynů, alkoholů, esterů a ketonů



# Kapalné stacionární fáze

Carbowaxy (polyethylenglykoly)

Ucony (polypropylenglykoly)

- polární stacionární fáze, s rostoucí  $M_r$  klesá polarita

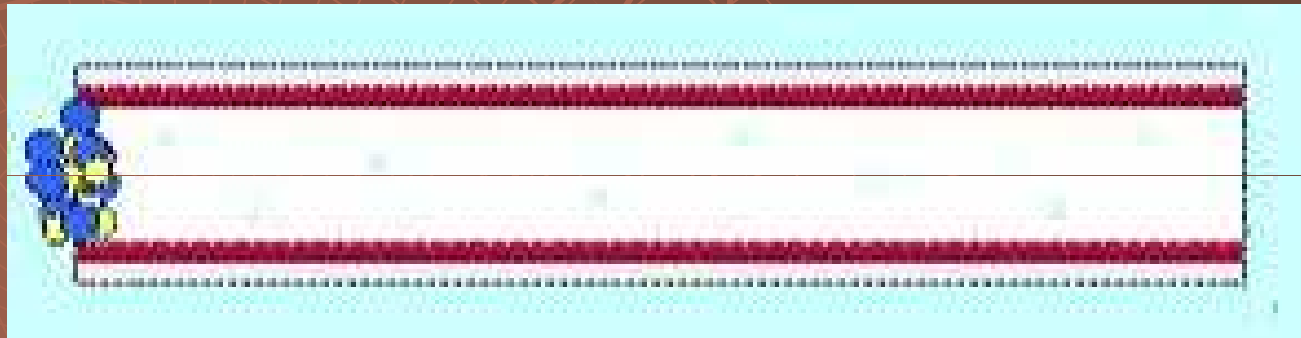
Polyestery (např. polyethylenglykoladipáty)

- polární stacionární fáze

Silikonové stacionární fáze (polysiloxany)

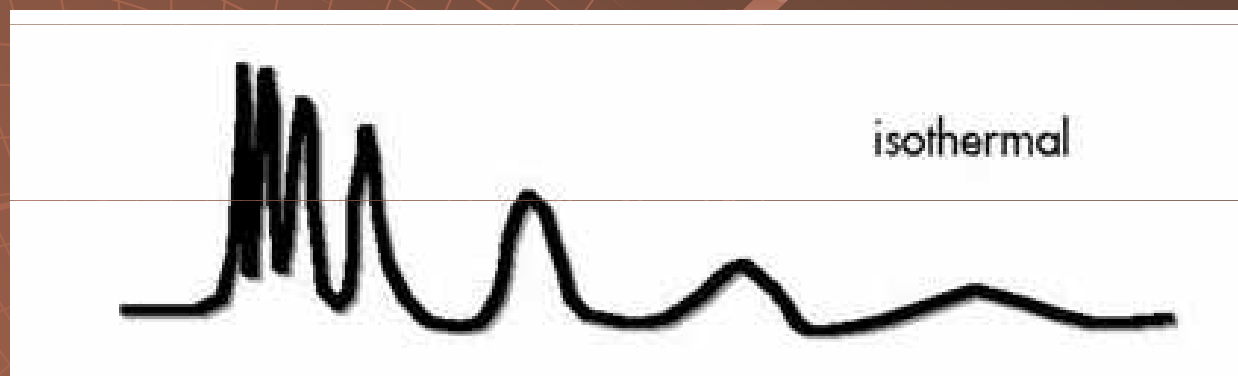
- často používané, široký rozsah polarity

# Eluce



# Eluce

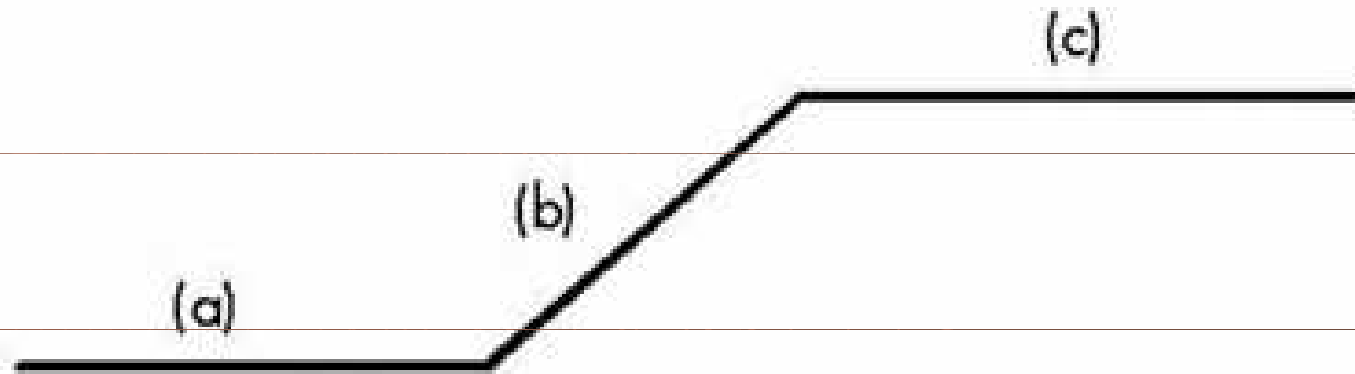
- ◆ Izotermální



- ◆ Gradientová – zvyšování teploty – 400 °C



# Eluce



a - initial temperature and time

b - ramp ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )

c - final hold time and temperature

# Detektory

Destruktivní x

Nedestruktivní

Universální x

Selektivní

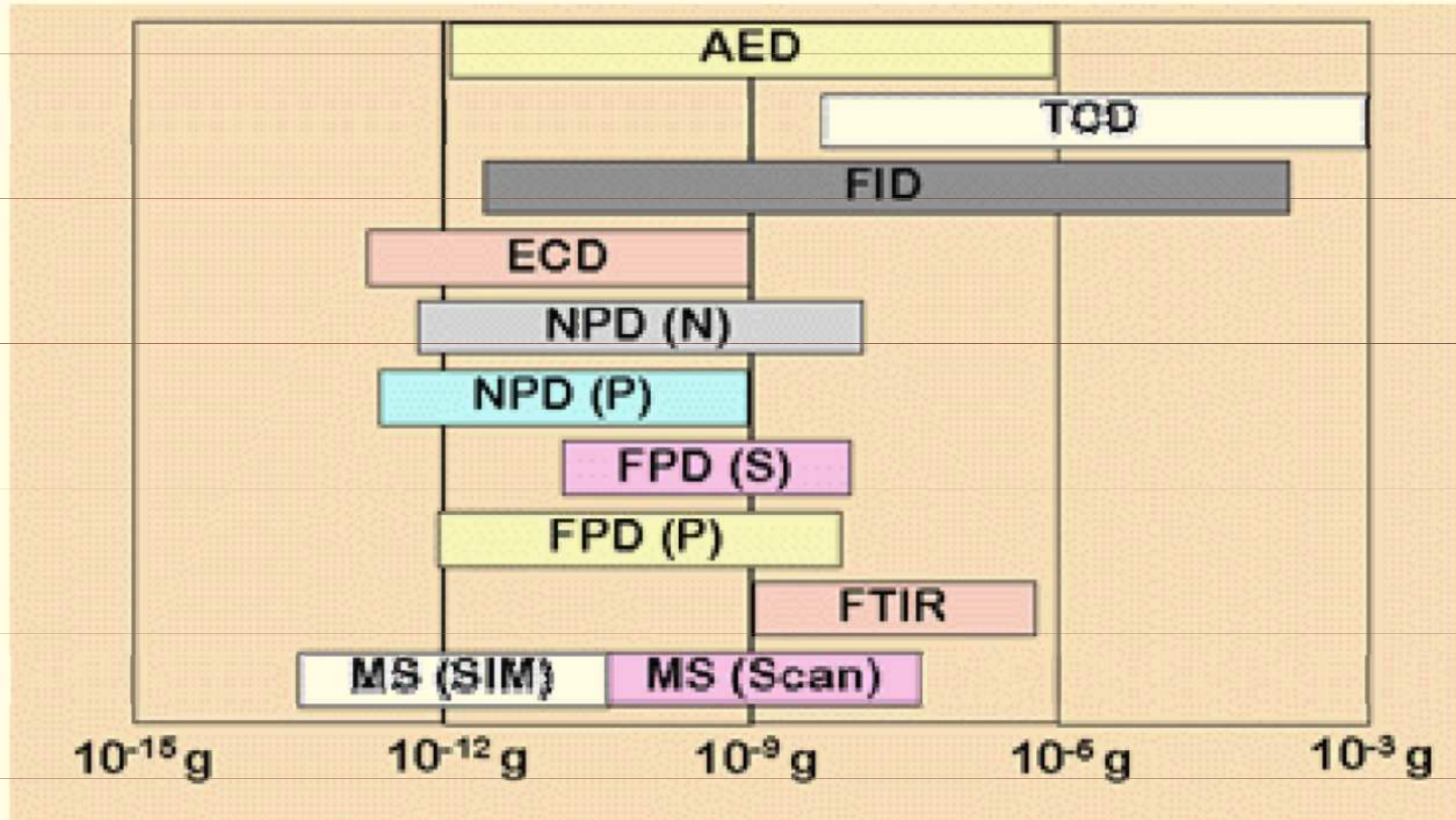
# Detektory

<b>Tepelně-vodivostní</b>	<b>Tepelná vodivost</b>
<b>Plamenově-ionizační</b>	<b>Ionizace (uhlovodíky)</b>
<b>Dusíko-fosforový</b>	<b>N,P - určité formy</b>
<b>Elektronového záchytu</b>	<b>Elektronegativní struktury</b>
<b>Atomově-emisní</b>	<b>Emisní záření</b>
<b>Plamenově-fotometrický</b>	<b>P, S - určité formy</b>
<b>Fotoionizační</b>	<b>Absorbce UV</b>
<b>Chemiluminiscenční</b>	<b>Excitace (O<sub>3</sub>, F<sub>2</sub>)</b>
<b>FTIR</b>	<b>IČ + Fourierova transformace</b>
<b>Hmotnostní</b>	<b>Ionizace</b>



# Detektory

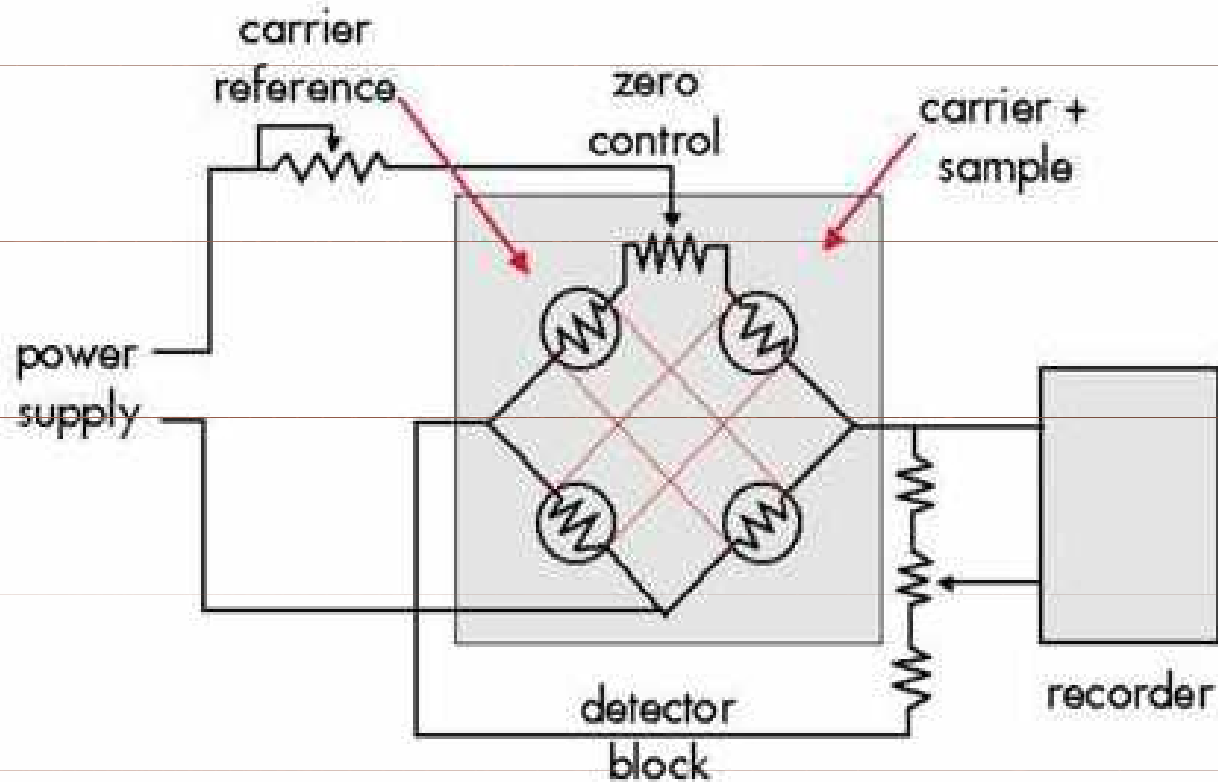
## Citlivost a pracovní rozsah GC detektorů



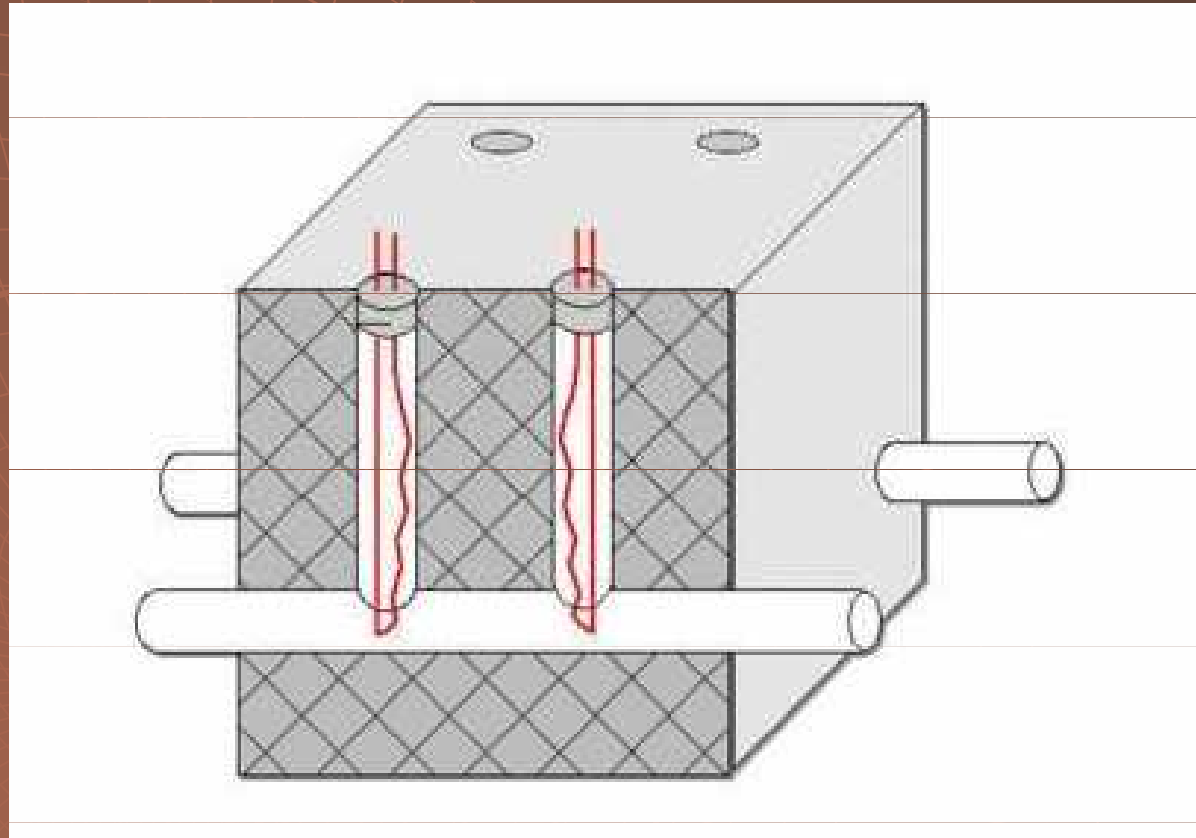
# Teplotně vodivostní detektor TCD

- ◆ Universální detektor
- ◆ Nedestruktivní detektor
- ◆ Lineární rozsah –  $10^6$
- ◆ Princip – změna tepelné vodivosti eluentu

# Teplotně vodivostní detektor TCD



# Teplotně vodivostní detektor TCD

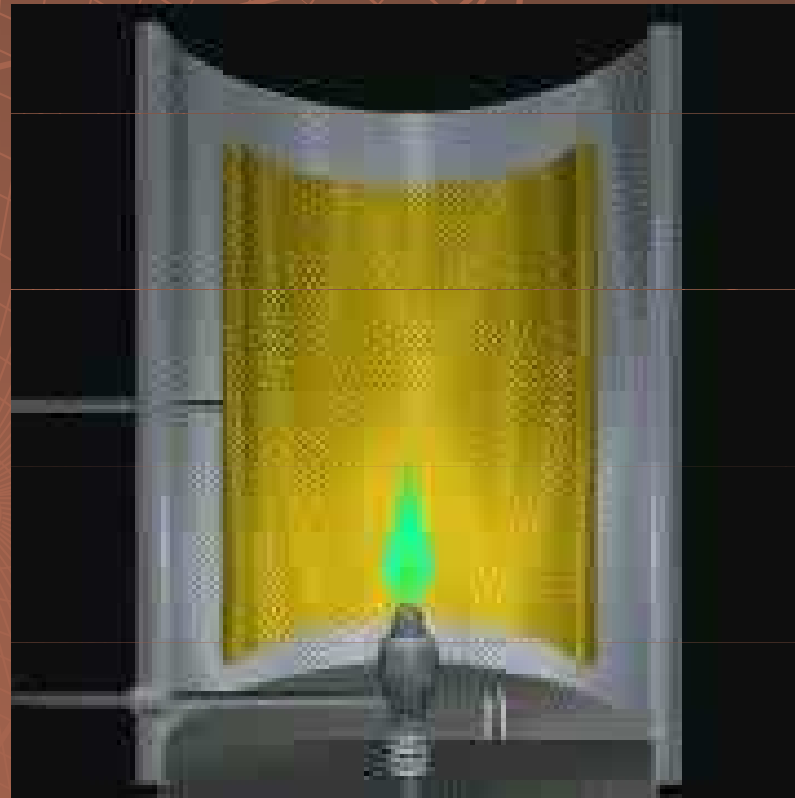


# Plamenově ionizační detektor FID

- ◆ Specifický
- ◆ Destruktivní
- ◆ Lineární rozsah –  $10^7$
  
- ◆ Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

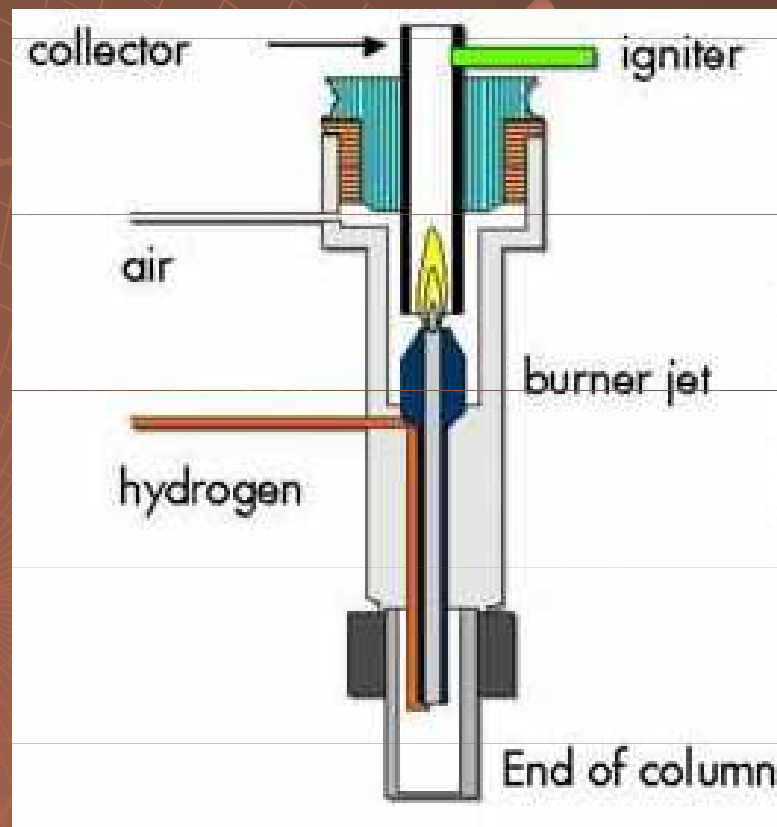


# Plamenově ionizační detektor FID





# Plamenově ionizační detektor FID

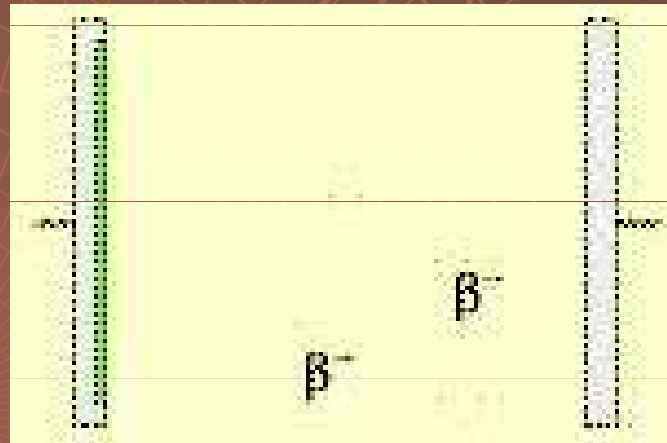


# Detektor elektronového záchytu ECD

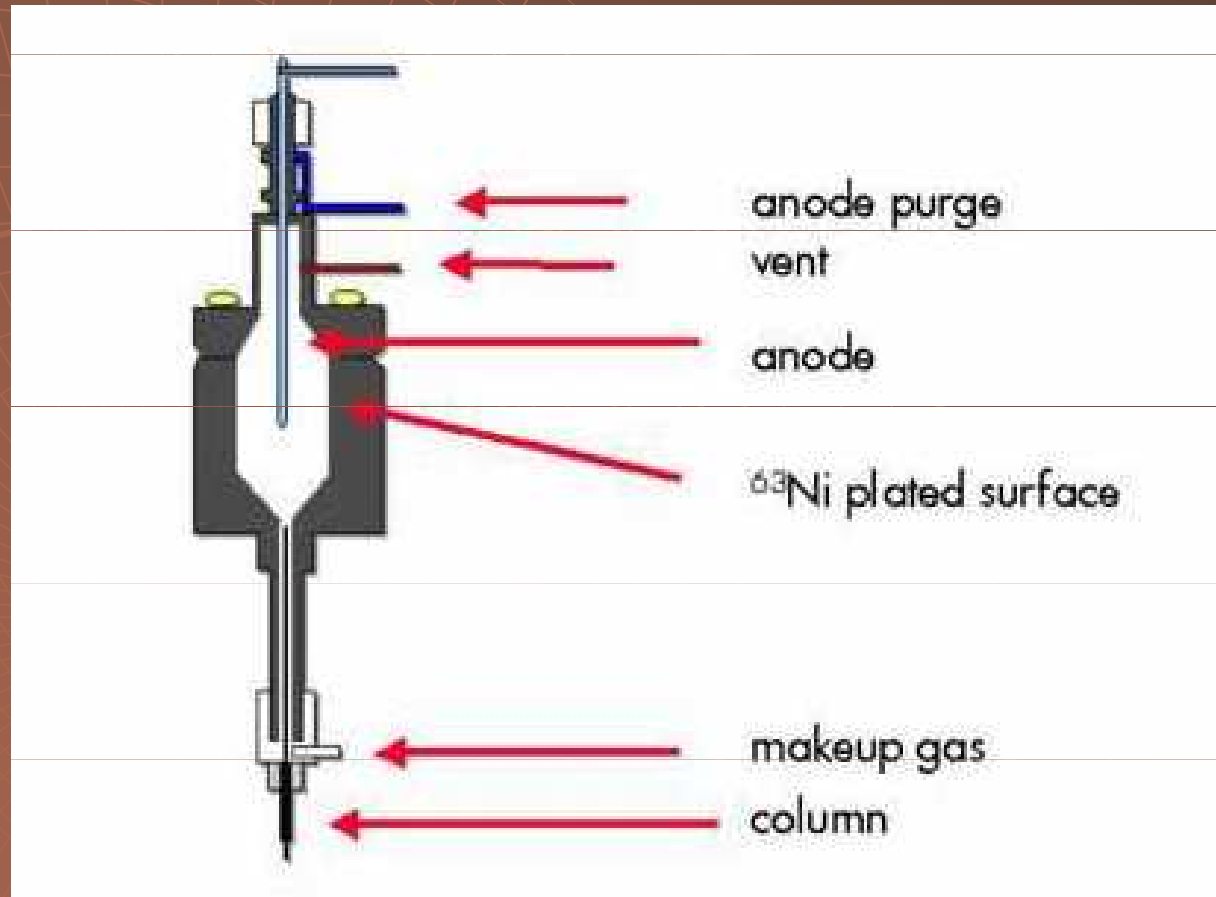
- ◆ Specifický
- ◆ Nedestruktivní
- ◆ Lineární rozsah –  $10^4$
- ◆ Princip – interakce  $\beta^-$  částic se vzorkem vyvolává pokles proudu

# Detektor elektronového záchytu ECD

$\beta^- - {}_{63}\text{Ni}$

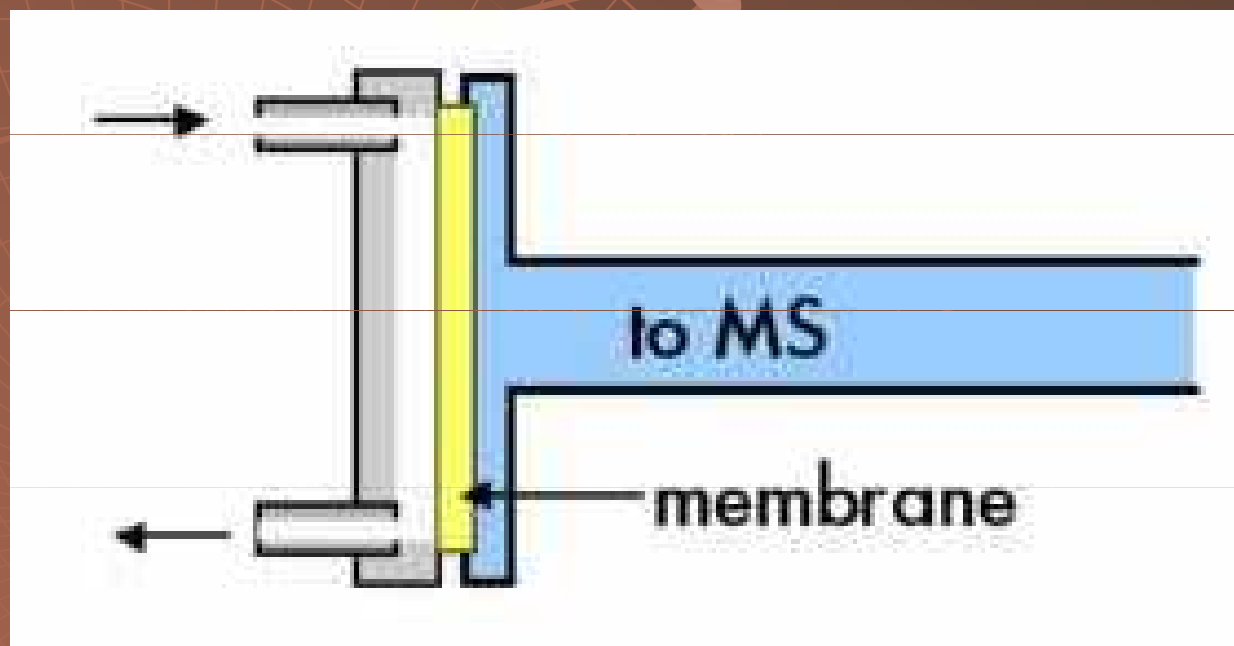


# Detektor elektronového záchytu ECD



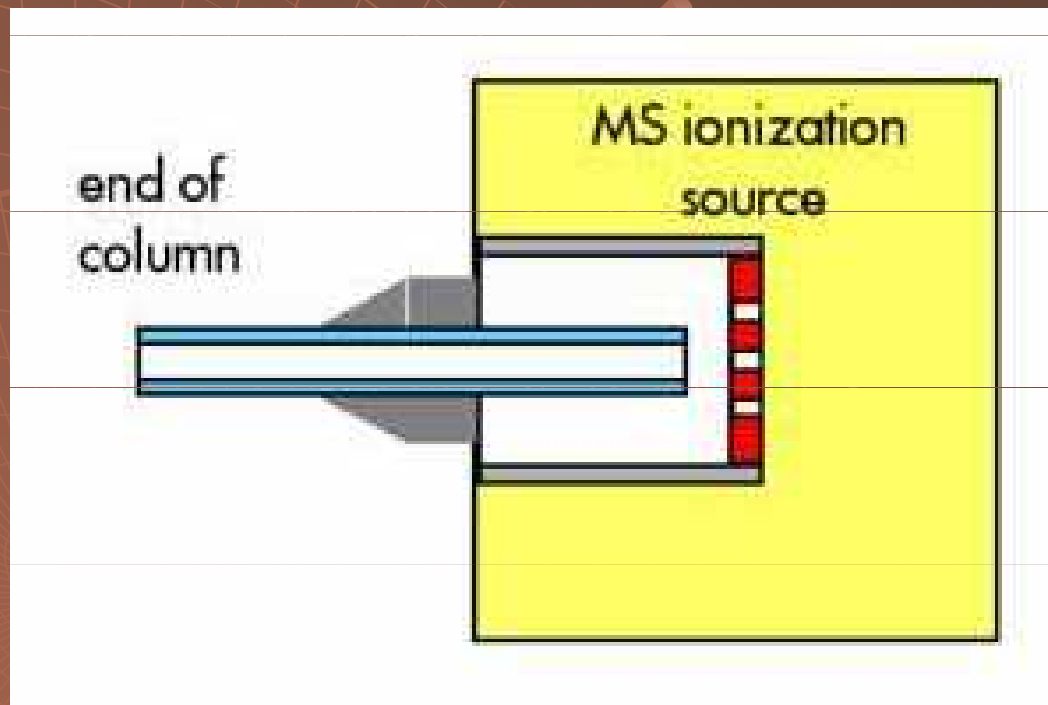
# GC MS

## permeační interface



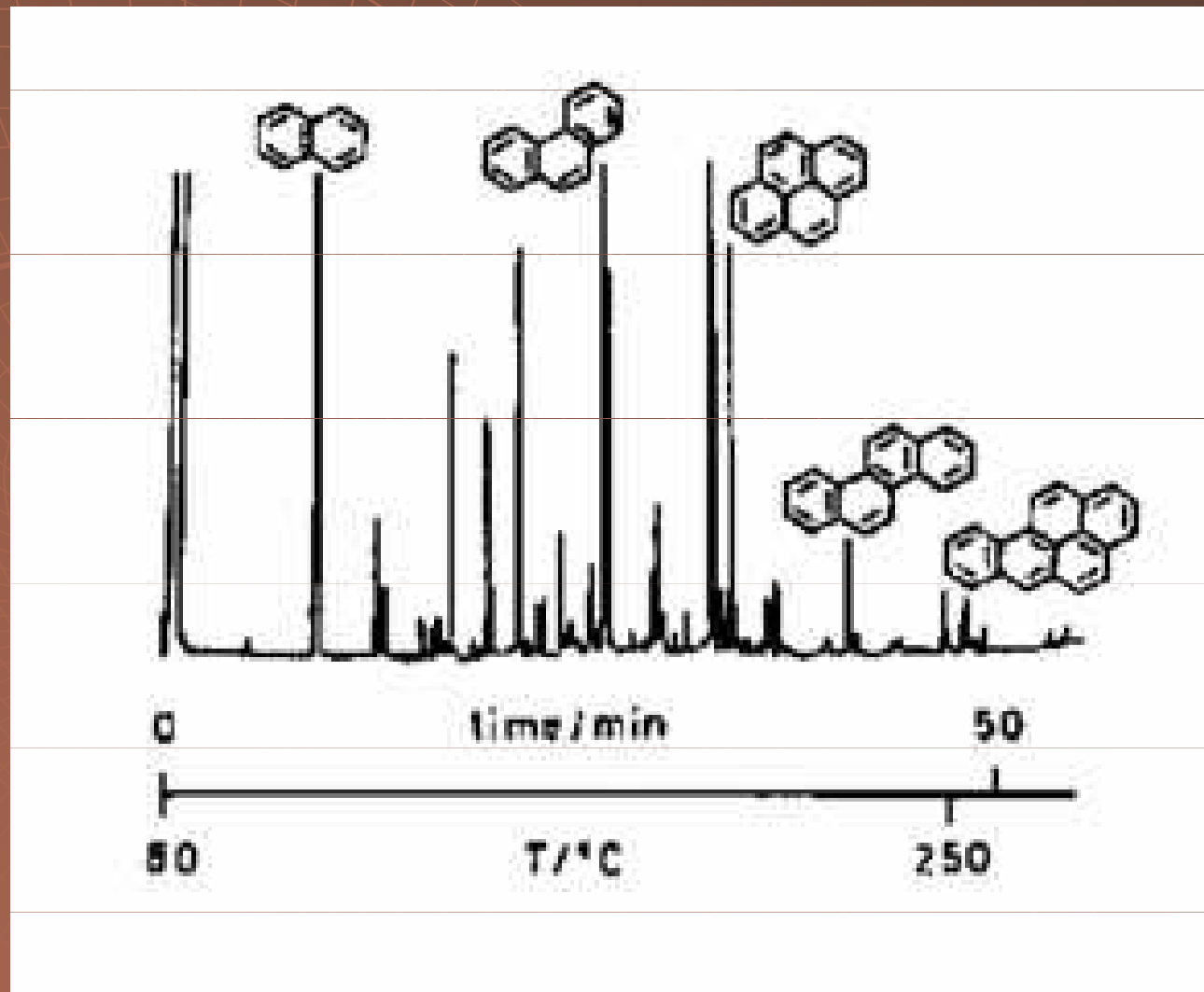
# GC MS

## přímé spojení

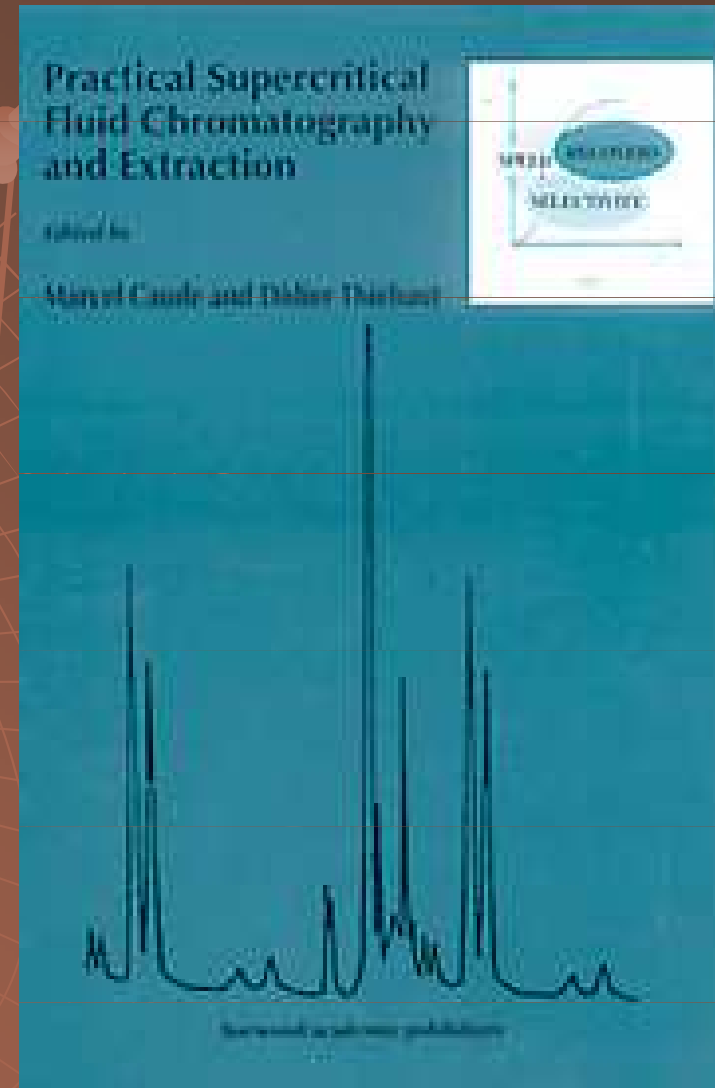
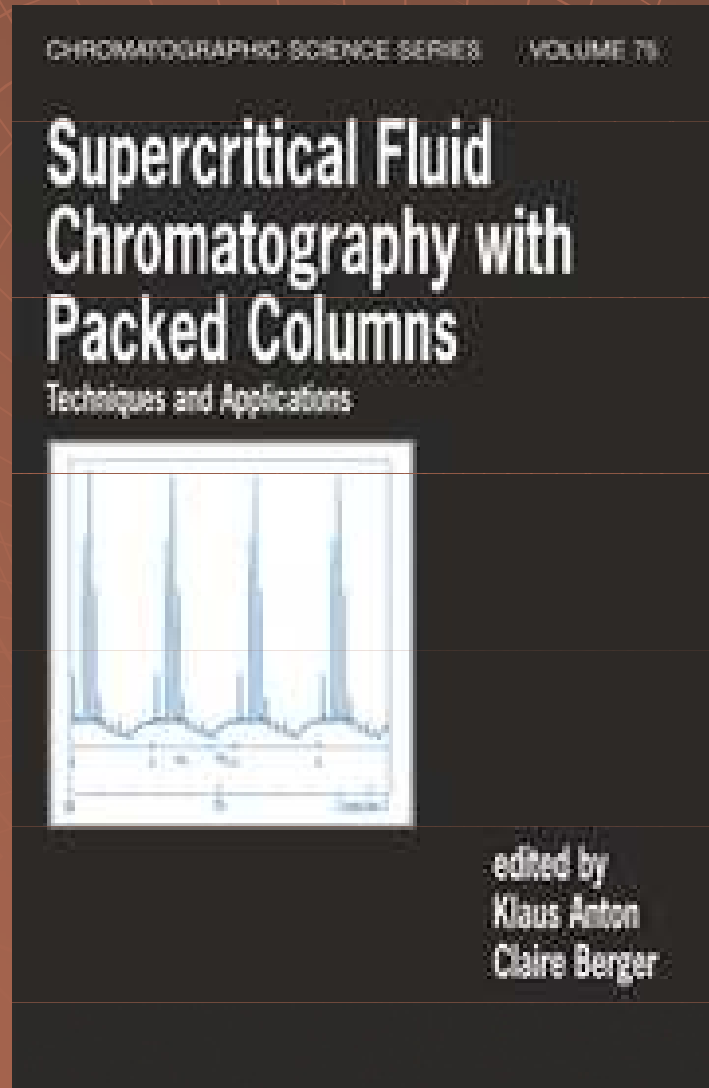




# GC analysa



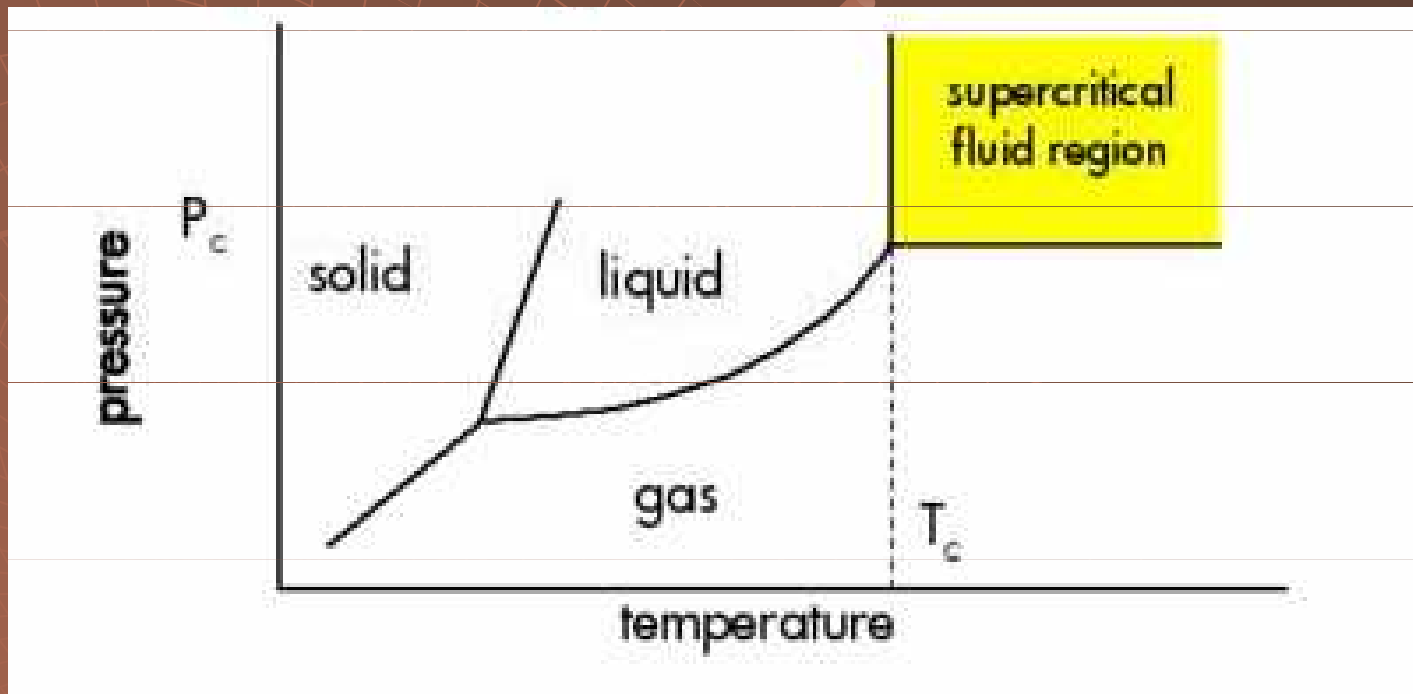
# Superkritická fluidní chromatografie



# Superkritická fluidní chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - superkritická kapalina
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

# Superkritická kapalina



# Superkritická kapalina

Fluid	$T_{c'}$ °C	$P_{c'}$ atm	$d'$
CO <sub>2</sub>	31.3	72.9	0.96
N <sub>2</sub> O	36.5	72.5	0.94
NH <sub>3</sub>	132.5	112.5	0.40
n-C <sub>5</sub>	196.6	33.3	0.51
n-C <sub>4</sub>	152.0	37.5	0.50
CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	111.8	40.7	1.12
CHF <sub>3</sub>	25.9	46.9	-----

$d'$  density in g/ml at 400 atm

# SFC x kompromis mezi GC a HPLC

GC

+ vysoká difuze

- vysoká teplota

+ nízká viskozita

- těkavé látky

HPLC

+ nízká teplota

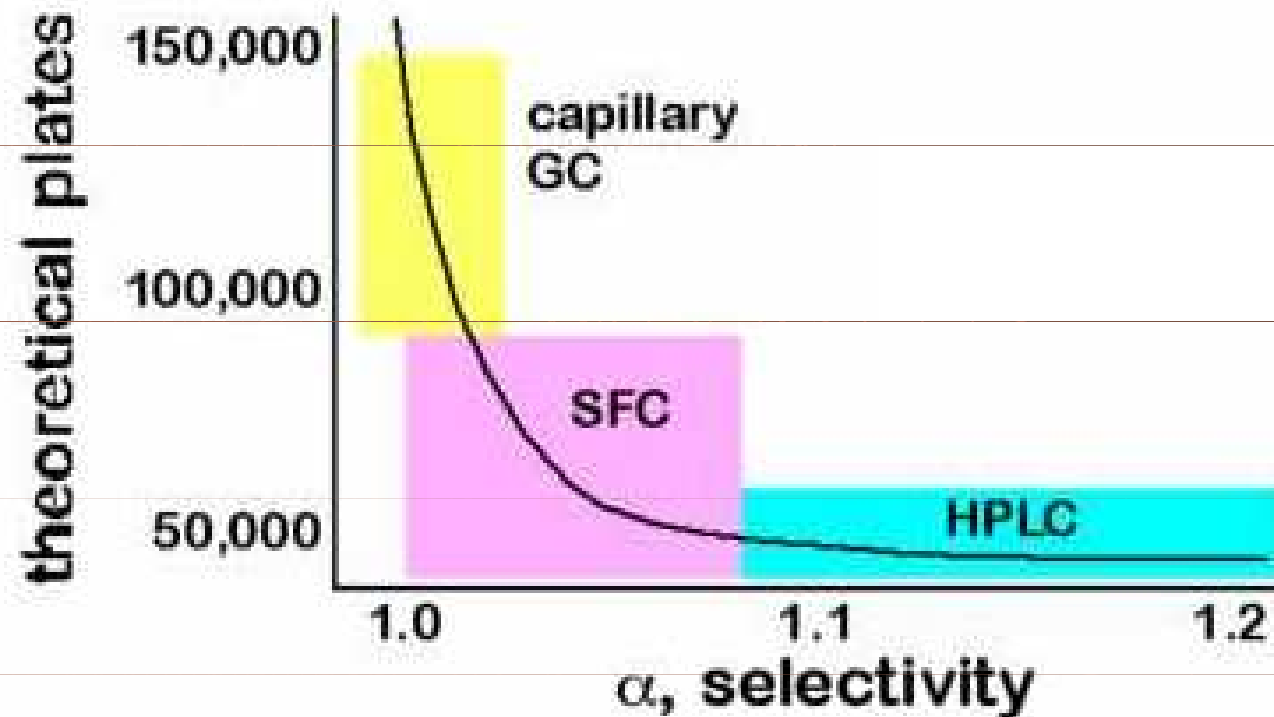
- nízká difuze

+ kapacita

- rychlost analýz



# Superkritická fluidní chromatografie



Number of plates required to achieve a separation with  $R_s = 1.5$  and  $k' = 2$

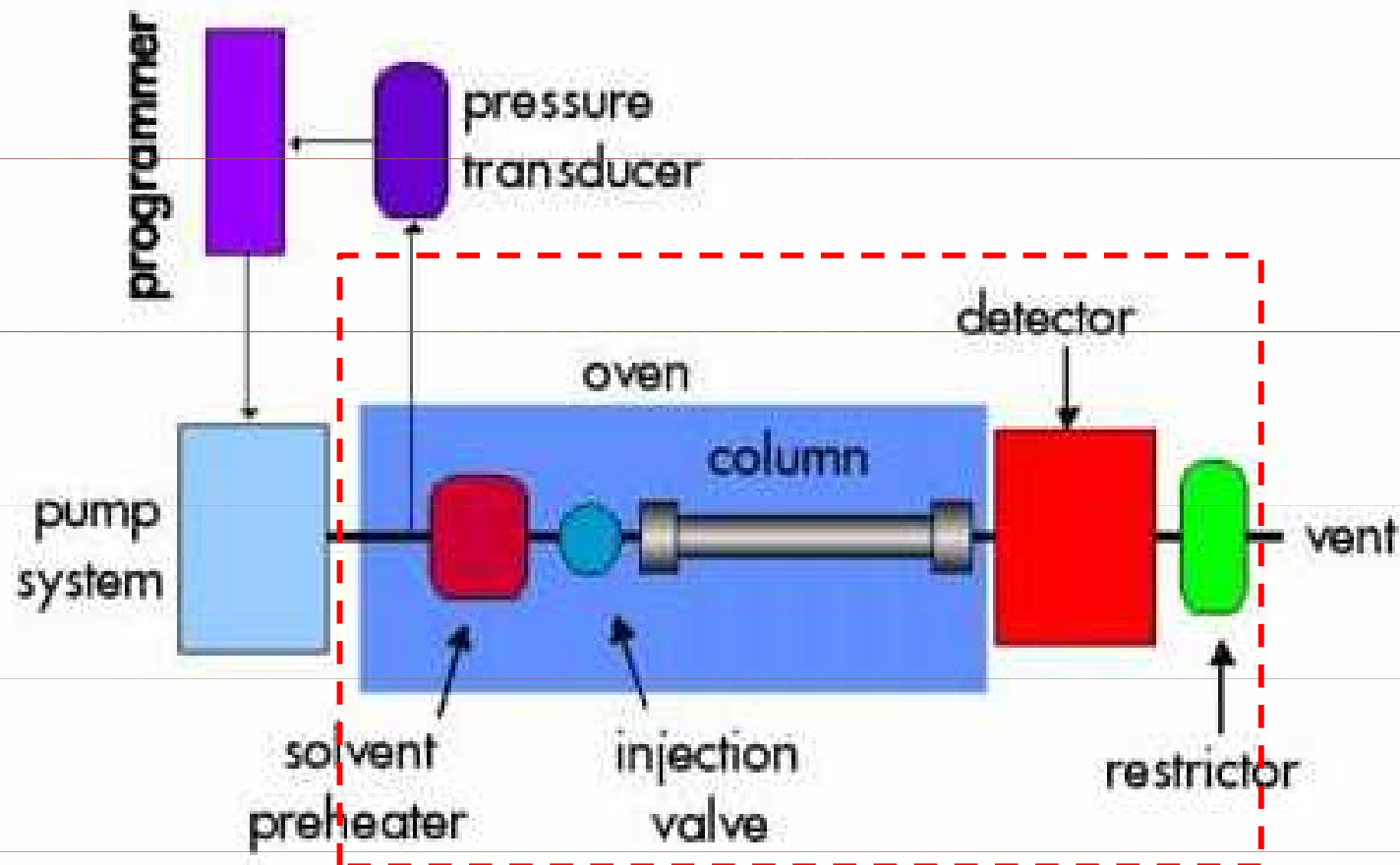
# Výhody

- ◆ Superkritická kapalina se viskozitou blíží fázi plynné, hustotou fázi kapalné
- ◆ Účinnosti srovnatelné s GC
- ◆ Rychlost větší než u LC
- ◆ Dobrá rozpouštěcí schopnost MF

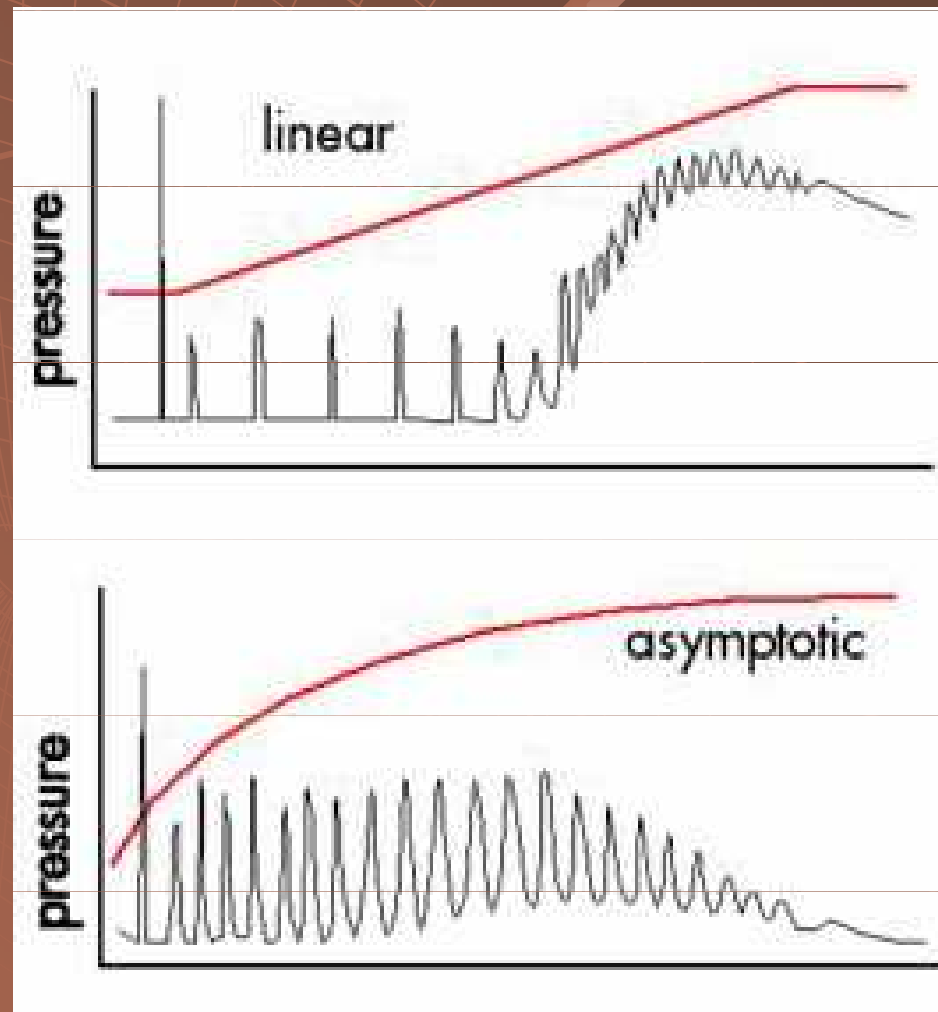
# Nevýhody

- ◆ Zařízení musí odolávat větším tlakům
- ◆ Vyšší cenová náročnost při srovnání s GC a LC

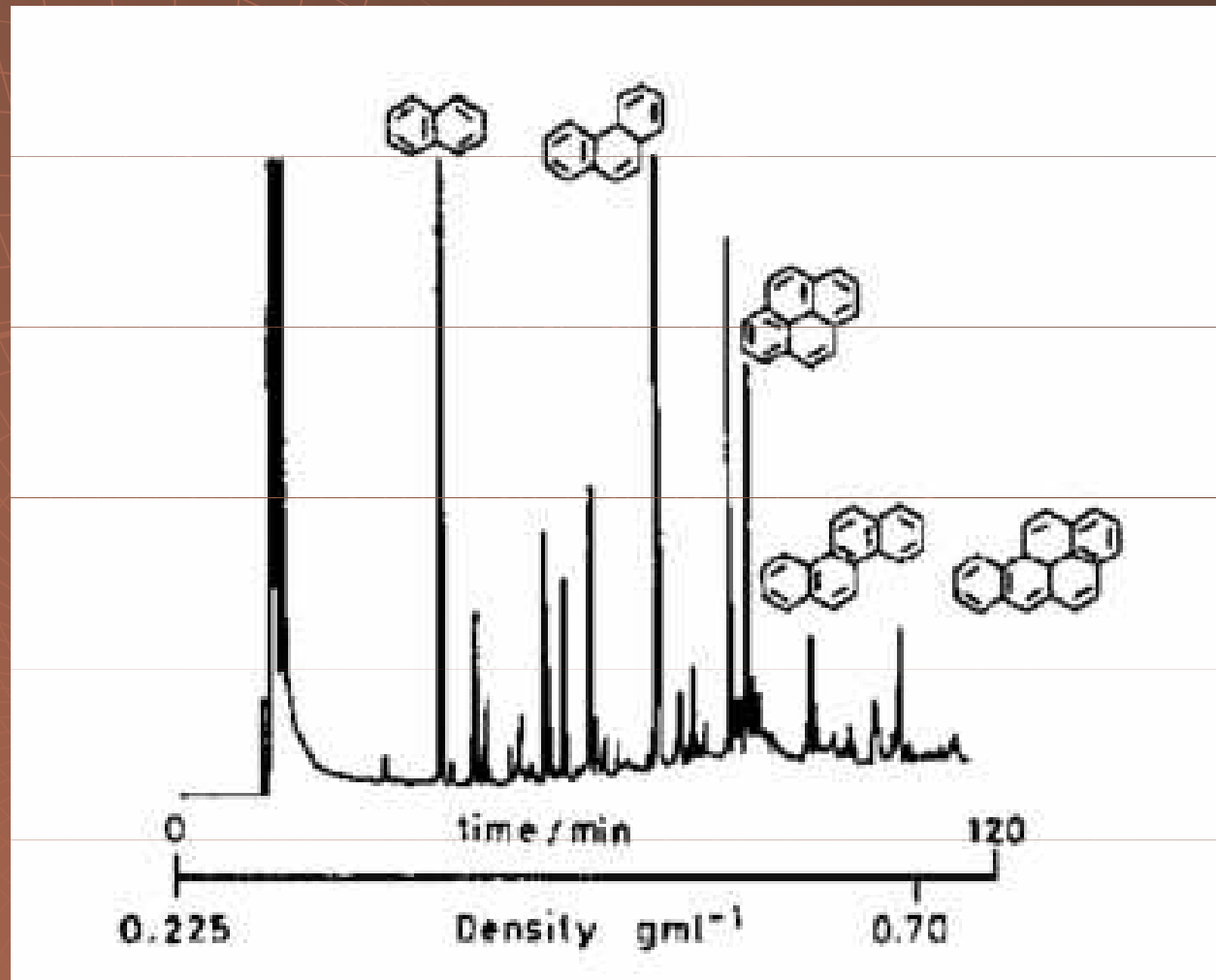
# Superkritická fluidní chromatografie



# Superkritická fluidní chromatografie

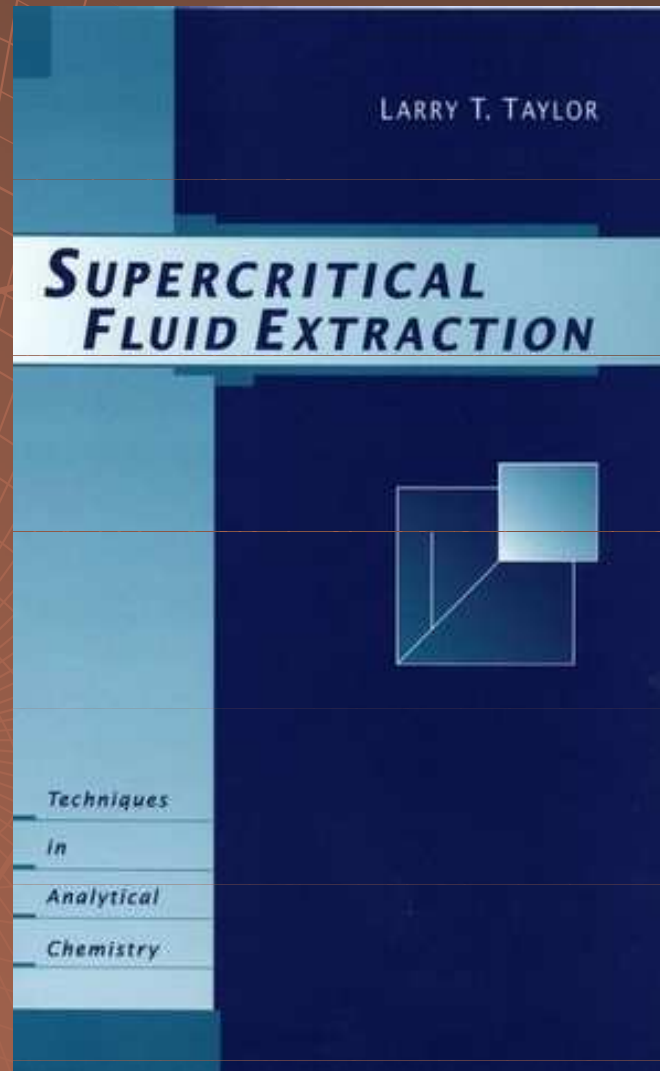


# SFC analyssa

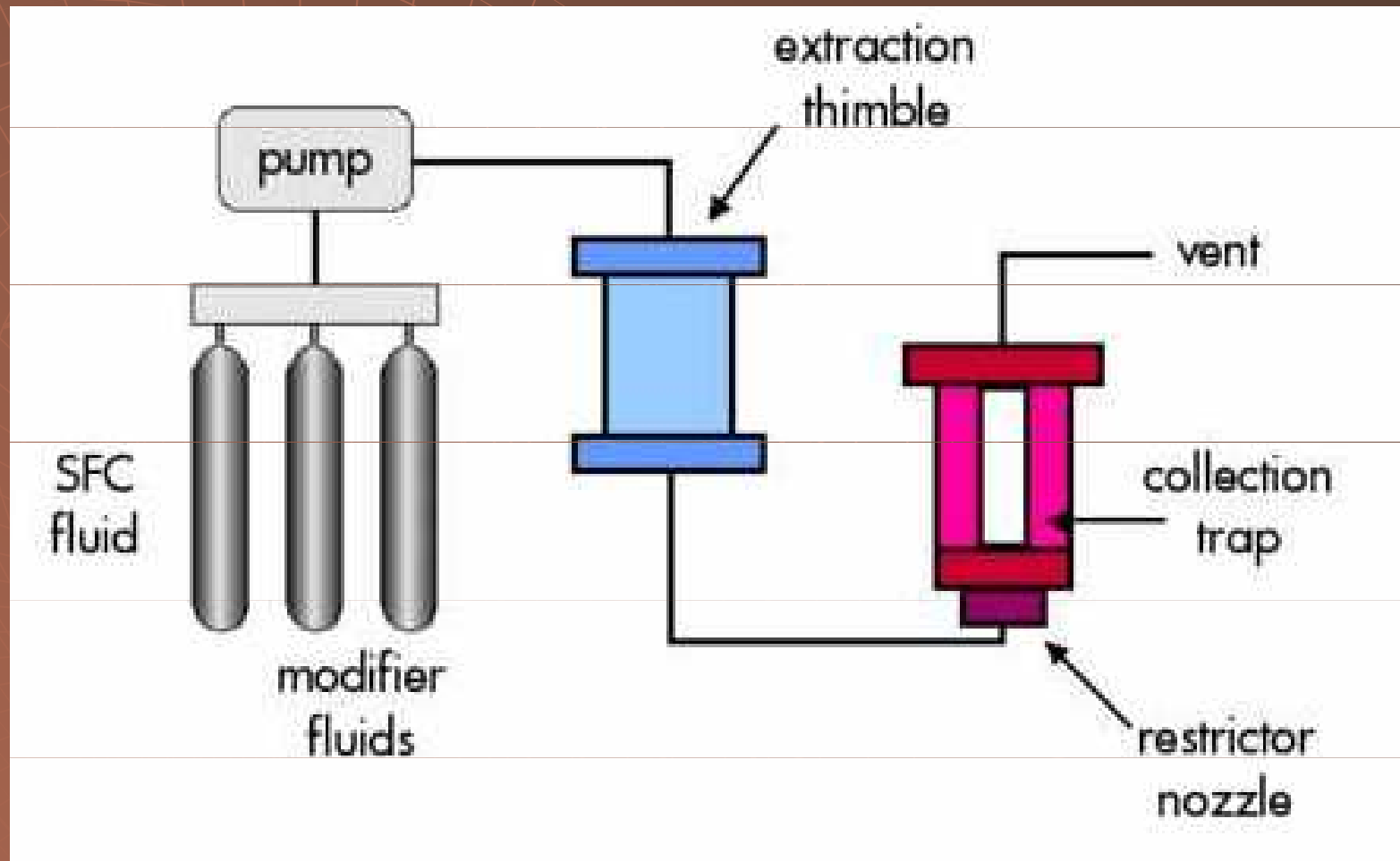




# Superkritická fluidní extrakce



# Superkritická fluidní extrakce



# Superkritická fluidní extrakce

- ◆ Používané kapaliny -  $\text{CO}_2$ 
  - levný,
  - netoxický
  - nízká kritická teplota
- ◆ Požívané modifikátory
  - $\text{HCl}$  – kyselé prostředí
  - $\text{NH}_3$  – bazické prostředí

# Superkritická fluidní extrakce

## ◆ Výhody

- 10-100x rychlejší přestup hmoty
- přímé ovlivnění extrakční síly měněním hustoty (změnou tlaku nebo teploty)
- velká redukce objemů extrahovadel
- některá SF-extrakční činidla jsou za normálních podmínek plyny ( $\text{CO}_2$ )  $\Rightarrow$  jednoduché odpaření

# Superkritická fluidní extrakce

## ◆ Nevýhody

- matricové efekty – neg. vliv matric; interakce se vzorkem i extrakční tekutinou

- složitá instrumentace – vysoké teploty a tlaky; práce s plyny (restriktor)



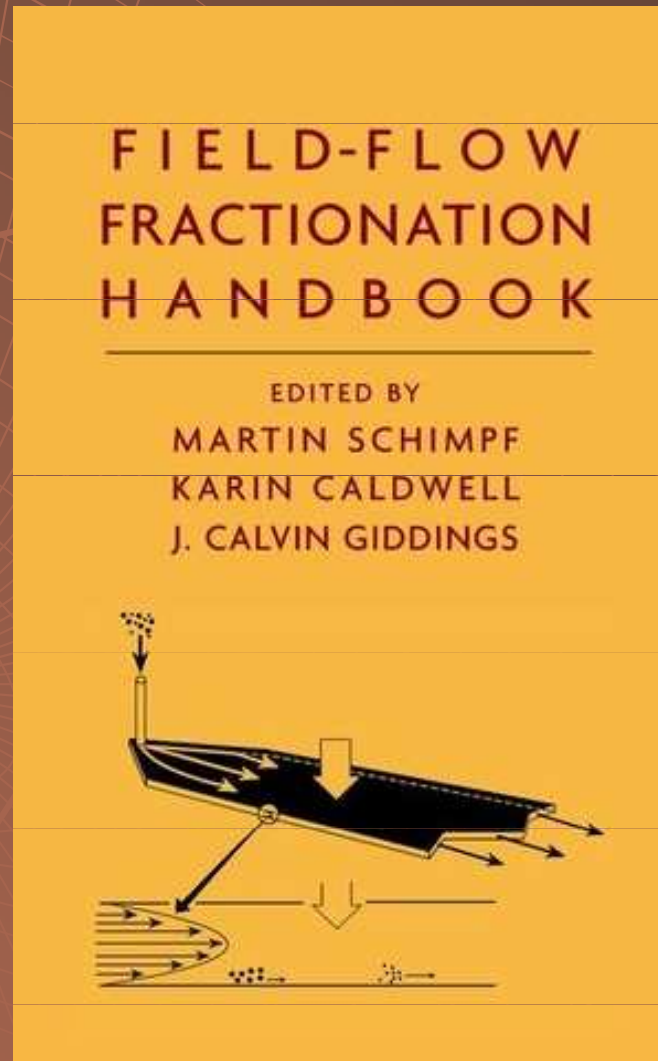
The background features a dark brown gradient with a faint, light brown grid pattern. A hand holding a pen is positioned as if writing on the grid. The text 'FFF' is written in a large, white, sans-serif font, centered horizontally and partially overlapping the grid and the hand.

FFF

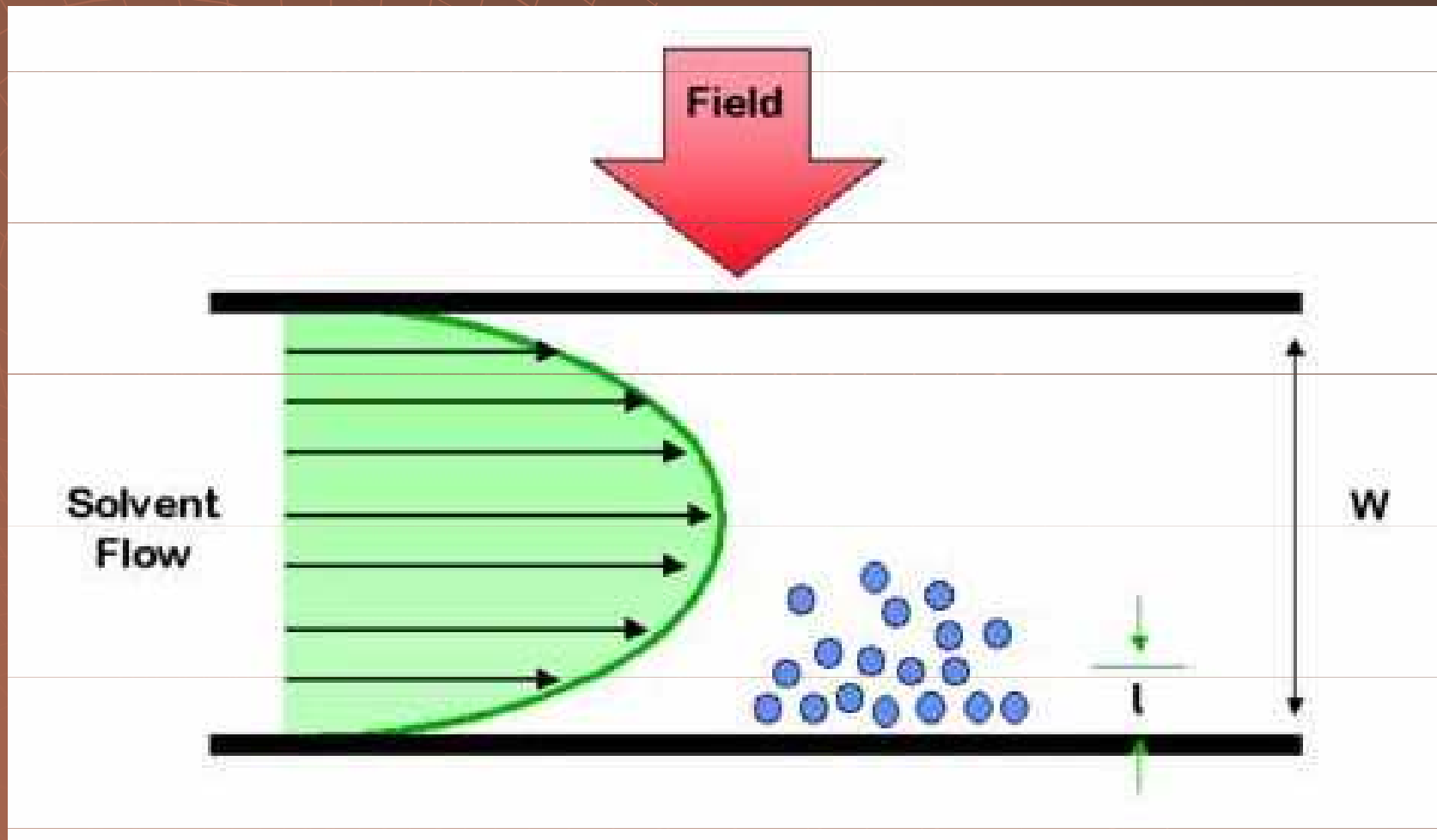
# Field Flow Fractionation



# Field Flow Fractionation princip



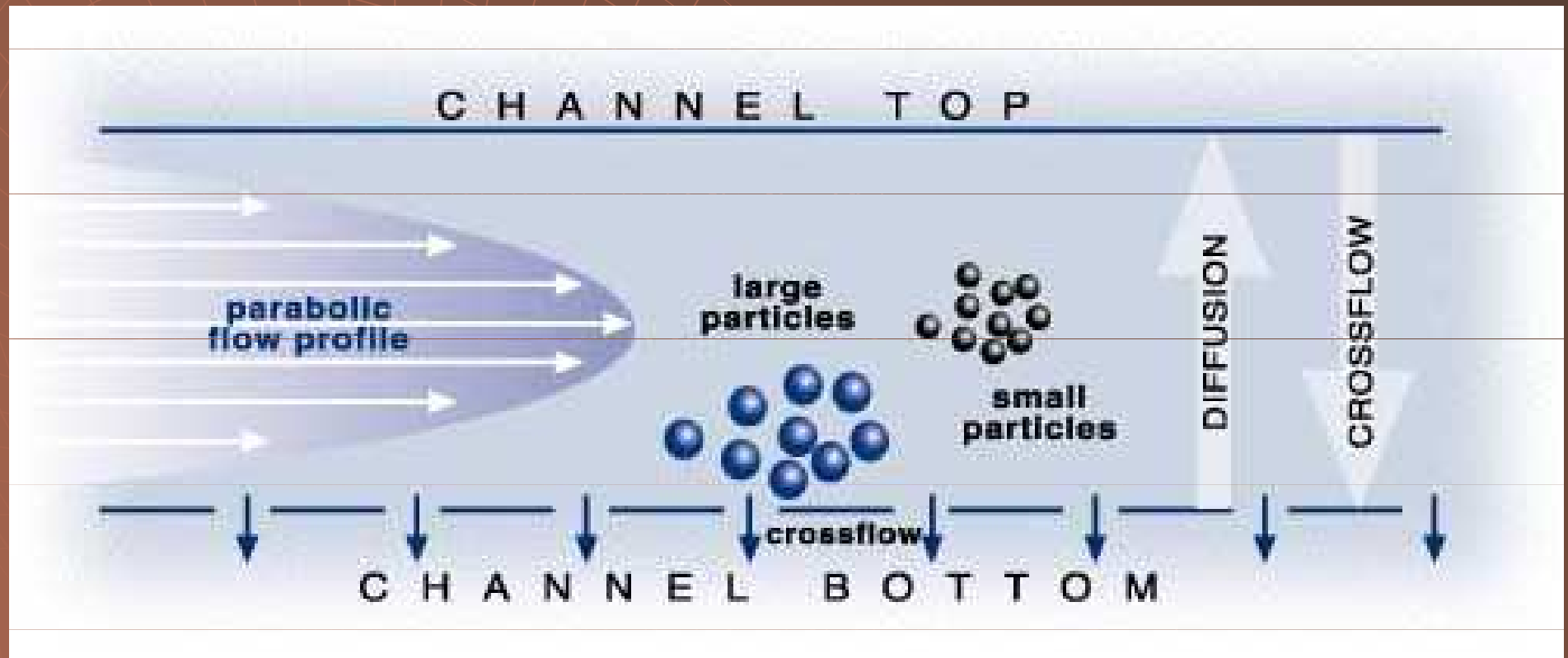
# Field Flow Fractionation principip



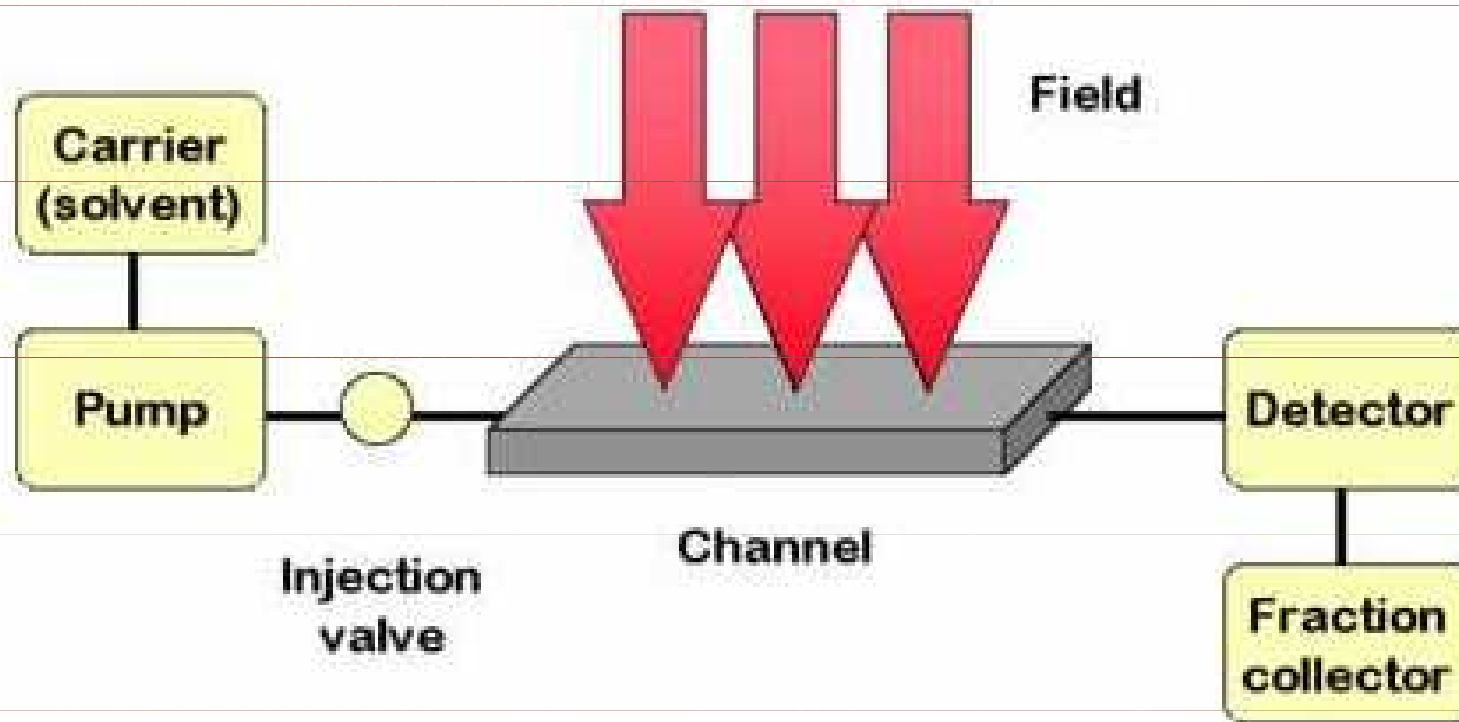
# Používaná pole

- ◆ Sedimentační
- ◆ Termální
- ◆ Hydraulické
- ◆ Elektrické

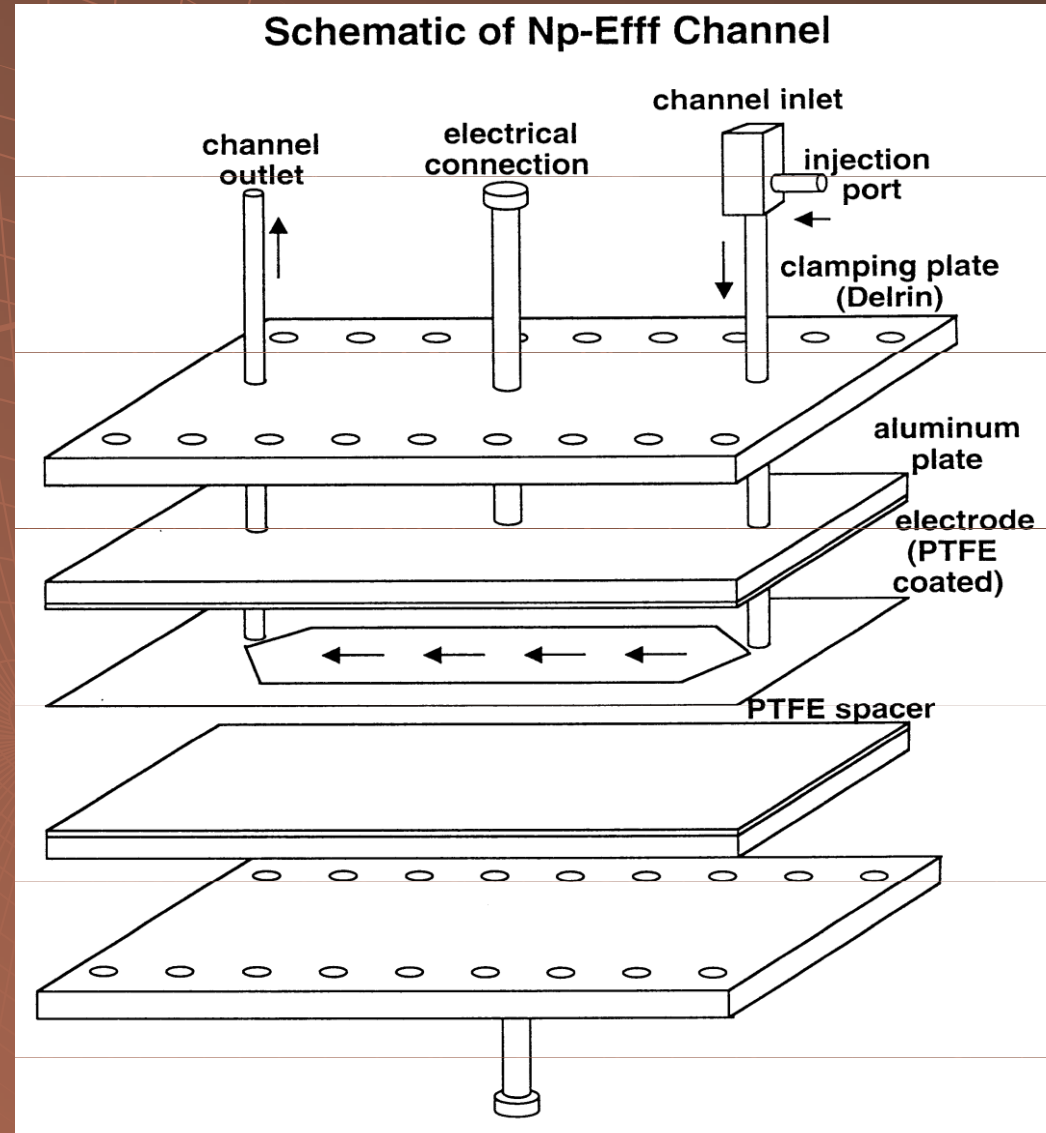
# Field Flow Fractionation princip



# Field Flow Fractionation instrumentace



# Field Flow Fractionation instrumentace





# Preparativní FFF

